

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 614**

51 Int. Cl.:

C07K 14/52 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2010 E 10705010 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2393832**

54 Título: **Proteínas truncadas con nudo de cistina**

30 Prioridad:

06.02.2009 EP 09152305

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.09.2015

73 Titular/es:

**PEPSCAN SYSTEMS BV (33.3%)
Zuidersluisweg 2
8243 RC Lelystad, NL;
UNIVERSITEIT MAASTRICHT (33.3%) y
ACADEMISCH ZIEKENHUIS MAASTRICHT
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**TIMMERMAN, PETER;
PUIJK, WOUTER CORNELIS;
HACKENG, TILMAN MATHIAS y
GRIFFIOEN, ARJAN WILLEM**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 545 614 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 truncadas con nudo de cistina

- 5 La invención se relaciona con los campos de la química de proteína, biología y medicina. Más específicamente, se relaciona con el diseño y preparación de mímicos de proteínas de los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina. Además, la invención se relaciona con el uso de mímicos de proteínas como un medicamento o agente profiláctico.
- 10 La estructura tridimensional del nudo de cistina se encuentra en muchas moléculas extracelulares y se conserva entre especies divergentes ^(ref 4). La estructura del nudo de cistina se forma por el arreglo de seis cisteínas que, a través de sus enlaces disulfuro forman un nudo. Un motivo consenso típico de una estructura de nudo de cistina es: X0-C1-X1-C2-X2-C3-X3-C4-X4-C5-X5-C6-X6, en donde las cisteínas 2, 3, 5 y 6 forman un anillo que incluye X2 y X3, mediante el enlace disulfuro de las cisteínas 2 y 5, y las cisteínas 3 y 6. El tercer enlace disulfuro entre las cisteínas 1 y 4 penetra el anillo, formando así un nudo ^(ref 2,3). La Figura 11 representa una representación esquemática de una proteína que comprende una estructura de nudo de cistina. Este plegado de nudo de cistina conduce a la formación de tres dominios distintos, con dos bucles de horquilla beta distorsionados (beta-1 y beta-3) que sobresalen a partir de un lado del nudo, y un único bucle de horquilla (beta-2) que sobresale a partir del otro lado del nudo. El bucle de horquilla beta-1 se forma por el tramo de aminoácidos entre C1 y C2 y se designa "X1" en el motivo de consenso anteriormente mencionado; los bucles de horquilla beta-2 ("X3") y beta-3 ("X4") se forman por el tramo de aminoácidos entre C3 y C4, y entre C4 y C5, respectivamente.
- 20 Los factores de crecimiento representan un gran grupo de polipéptidos que comparten la propiedad de inducir la multiplicación celular tanto *in vivo* como *in vitro*. Aunque el nivel de similitud de secuencias entre los factores de crecimiento es bajo, se pueden clasificar en subfamilias basándose en sus similitudes estructurales y funcionales. Por ejemplo, todas las siguientes subfamilias de factores de crecimiento muestran la conformación nudo de cistina descrita anteriormente: subfamilia de la hormona de glicoproteína-beta (GLHB), subfamilia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), subfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), subfamilia del factor de crecimiento nervioso (NGF), subfamilia de la hormona de glicoproteína- alfa (GLHA), subfamilia CTCK, subfamilia de tipo Noggin, subfamilia de Coagulina, subfamilia de tipo Mucina, subfamilia antagonista de BMP de tipo Mucina, subfamilia hemolectina tipo Mucina, subfamilia de tipo hendidura, y subfamilia de tipo Jagged. Sin embargo, las diferentes sub-familias tienen por ejemplo diferentes longitudes consenso para X1, X2, X3, X4 y/o X5. Además, las diferentes subfamilias tienen funciones y órganos objetivo completamente diferentes. Por ejemplo, las subfamilias GLHA y GLHB son importantes para los procesos fisiológicos implicados en la reproducción, mientras que los miembros de la subfamilia NGF ejercen su función principalmente en las células nerviosas, y los miembros de la subfamilia de PDGF principalmente en células endoteliales.
- 25 A continuación de las cisteínas implicadas en la formación de nudo de cistina, otras cisteínas se pueden presentar en una proteína con nudo de cistina, que normalmente se usan para crear enlaces disulfuro adicionales dentro del nudo de cistina, dentro de los dominios que sobresalen, o entre dos proteínas, por ejemplo durante la dimerización.
- 30 Ha habido una extensa investigación sobre los factores de crecimiento con nudo de cistina en la salud y enfermedad, y los ejemplos terapéuticos, por ejemplo, son el uso de anticuerpos específicos al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; una sub-subfamilia de la subfamilia de PDGF) en el tratamiento del cáncer, Bevacizumab (Avastin™), un anticuerpo monoclonal desarrollado por Genentech se aprobó en 2004 por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento del cáncer colorrectal, y el desarrollo de una vacuna de la hormona folículo estimulante (FSH; un miembro de la subfamilia GLHA/B) como un anticonceptivo para hombres. Los principales inconvenientes del anticuerpo monoclonal terapéutico Bevacizumab específico a VEGF son los altos costos de producción y cantidades relativamente grandes necesarias para el tratamiento, a veces baja penetración en el tumor y sus efectos secundarios. Además, el anticuerpo se debe administrar muchas veces durante unos meses poniendo una carga sobre el paciente. WO 00/37025 describe un derivado de VEGF-D truncado y anticuerpos dirigidos contra este derivado. Se describe el uso de los anticuerpos para interferir con la actividad de VEGF-D mediada por VEGFR-2 y/o con la unión de VEGF-D a VEGFR-3.
- 35 Un objetivo de la presente invención es proporcionar mímicos de proteínas de los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, que son preferentemente capaces de inducir una respuesta inmune contra dichos miembros. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar medios y métodos alternativos para el tratamiento y/o profilaxis de afecciones relacionadas con la proteína con nudo de cistina.
- 40 La invención proporciona mímicos de proteínas de los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, preferentemente para el uso en composiciones inmunogénicas y/o terapéuticas.

Como se dijo antes, las proteínas con nudos de cistina tienen una conformación compleja que comprende un anillo que

se constituye de al menos dos tramos de aminoácidos y dos enlaces disulfuro que conectan dichos tramos de aminoácidos. Un tercer enlace disulfuro penetra en el anillo, formando un nudo. Todos los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina tienen además en común que los tramos de aminoácido entre la primera y la segunda cisteína y la cuarta y quinta cisteína forman bucles de horquilla beta que sobresalen en una dirección, mientras que otro tramo de aminoácido, que se sitúa entre las cisteínas tres y cuatro, sobresale a partir del sitio opuesto de la molécula. (Figura 11). En una primera modalidad, la invención proporciona un mimico de proteína de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, siendo capaz dicho mimico de proteína de inducir una respuesta inmune contra dicho miembro y que tiene el motivo XO-C1-X1-C2-X2-C3-X3-C4-X4-C5-X5-C6-X6, en donde C1 a C6 son residuos de cisteína que forman una estructura de nudo de cistina en la que C1 se enlaza a C4, C2 se enlaza a C5 y C3 se enlaza a C6, y en donde X0 y X6 representan, independientemente uno de otro, una secuencia de aminoácidos con una longitud de 0 a 10 aminoácidos, preferentemente 0 a 5 aminoácidos, con mayor preferencia de 0 a 3 aminoácidos, con mayor preferencia 0 a 2 aminoácidos, aún con mayor preferencia 0 o 1 aminoácido, más preferible 0 aminoácido, X2 representa una secuencia de aminoácido con una longitud de 2 a 24 residuos de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos situada entre C2 y C3 de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 residuo de aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 15 a 50 aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos situada entre C1 y C2 de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 3 a 36 aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos situada entre C3 y C4 de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 15 a 50 aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos situado entre C4 y C5 de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina y en donde al menos una cisteína en cualquiera de las secuencias representadas por X1, X2, X3, X4 y X6 se sustituye por otro residuo de aminoácido. Preferentemente, C2, C3, C5 y C6 forman un anillo por un enlace entre C2 y C5, y entre C3 y C6, en donde el tercer enlace entre C1 y C4 penetra el anillo, formando así un nudo de cistina. En una modalidad preferida, se proporciona un peptidomimético de acuerdo con la invención, para lo cual el número total de aminoácidos es igual a 130 o menos, preferentemente 110 o menos, con mayor preferencia 100 o menos, aún con mayor preferencia 90 o menos, con la máxima preferencia 80 o menos.

En una modalidad preferida, se proporciona un mimico de proteína de acuerdo con la invención, en donde X1, X2, X3 y X4 cada uno representa una secuencia de aminoácido con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos del mismo miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina. Esto significa así que la invención proporciona un mimico de proteína de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, siendo capaz dicho mimico de proteína de inducir una respuesta inmune contra dicho miembro y que tiene el motivo XO-C1-X1-C2-X2-C3-X3-C4-X4-C5-X5-C6-X6, en donde C1 a C6 son residuos de cisteína que forman una estructura de nudo de cistina en la que C1 se enlaza a C4, C2 se enlaza a C5 y C3 se enlaza a C6, y en donde X0 y X6 representan, independientemente uno de otro, una secuencia de aminoácidos con una longitud de 0 a 10 aminoácidos, preferentemente 0 a 5 aminoácidos, con mayor preferencia de 0 a 3 aminoácidos, con mayor preferencia 0 a 2 aminoácidos, con mayor preferencia 0 o 1 aminoácido, más preferible 0 aminoácido, X2 representa una secuencia de aminoácido con una longitud de 2 a 24 residuos de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos situada entre C2 y C3 de dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 residuo de aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 15 a 50 aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos situada entre C1 y C2 de dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 3 a 36 aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos situada entre C3 y C4 de dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 15 a 50 aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos situado entre C4 y C5 de dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina y en donde al menos una cisteína en cualquiera de las secuencias representadas por X1, X2, X3, X4 y X6 se sustituye por otro residuo de aminoácido. Preferentemente, C2, C3, C5 y C6 forman un anillo por un enlace entre C2 y C5, y entre C3 y C6, en donde el tercer enlace entre C1 y C4 penetra el anillo, formando así un nudo de cistina. En una modalidad preferida, se proporciona un peptidomimético de acuerdo con la invención, para lo cual el número total de aminoácidos es igual a 130 o menos, preferentemente 110 o menos, con mayor preferencia 100 o menos, aún con mayor preferencia 90 o menos, con la máxima preferencia 80 o menos.

Un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina se define en la presente descripción como cualquier proteína que forma una estructura tridimensional de nudo de cistina típica como se describió anteriormente, así con al menos seis cisteínas que forman un nudo de cistina y tres bucles de horquilla que sobresalen a partir del

nudo, en donde las cisteínas 2, 3, 5 y 6 forman un anillo por un enlace entre las cisteínas 2 y 5, así como entre las cisteínas 3 y 6, y en donde el tercer enlace entre las cisteínas 1 y 4 penetra el anillo, formando así el nudo. Una persona con experiencia en la técnica es capaz, por ejemplo por una combinación de búsqueda de patrón y alineamiento de pares, identificar motivos estructurales, presentes en los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina. Una persona con experiencia en la técnica se puede guiar en su búsqueda, por ejemplo, por las proteínas conocidas con nudos de cistina que pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, por ejemplo, por los ejemplos no limitantes proporcionados en la Figura 10.

Los inventores han proporcionado la idea de que las llamadas "proteínas truncadas con nudos de cistina" de acuerdo con la invención son especialmente útiles para tratar o prevenir trastornos relacionados con proteína con nudo de cistina. Han mostrado, por ejemplo, que un VEGF truncado de acuerdo con la invención muestra actividad hormonal insignificante, mientras que sus propiedades inmunológicas son excelentes. Una de las ventajas de la actividad hormonal insignificante de VEGF truncado de acuerdo con la invención es, por ejemplo, que una cantidad significativa de VEGF truncado se puede administrar a un animal, sin los efectos secundarios hormonales de la proteína entera. Otra ventaja del VEGF truncado en comparación con la proteína nativa o fragmentos más pequeños de estos, es que VEGF truncado es inmunogénico per se. Esto es debido al hecho de que, en contraste con los fragmentos más pequeños, VEGF truncado es lo suficientemente grande para ser inmunogénico sin ser acoplado a una proteína portadora y, en contraste con la proteína nativa, es suficiente "no nativo" para ser visto como no propio por el sistema inmune. Con no-propio se entiende que el sistema inmune no considera la proteína o partes de la proteína como una proteína propia y por lo tanto monta una respuesta inmune hacia dicha proteína. Sin limitarse a la teoría, el hecho de que una proteína truncada de acuerdo con la invención es vista como "no propia" se explica, por ejemplo, por el concepto de "péptidos crípticos". Los péptidos crípticos se definen como péptidos que son parte de una proteína (propia), pero en condiciones normales no se presentan al sistema inmune. El sistema inmune es "ignorante" de estos péptidos crípticos. Las proteínas tomadas por las células presentadoras de antígenos se procesan, es decir, se cortan en pequeños fragmentos peptídicos. Bajo condiciones normales, estos pequeños fragmentos peptídicos de una proteína dada son más o menos idénticos después de cada procesamiento. Estos son llamados péptidos dominantes. Cada vez que una proteína dada se procesa produce por ejemplo péptidos x, y, z en suficiente cantidades que se presentan de manera efectiva al sistema inmune. El sistema inmune, siendo constantemente expuesto a péptidos x, y, z de proteínas propias, ignora estos péptidos dominantes de proteínas propias, mientras se reaccionan a los péptidos dominantes de proteínas no propias, que están de vez en cuando presentes. Si, sin embargo, una proteína propia se trunca por ejemplo de acuerdo con la invención, los fragmentos peptídicos después del procesamiento en las células presentadoras de antígenos difieren de la proteína nativa completa. Como resultado los llamados "péptidos crípticos", péptidos que normalmente no se presentan, se generan y se presentan al sistema inmune en cantidades suficientes. En lugar de, por ejemplo, los péptidos propios dominantes x, y, z, los péptidos x, z y w se generan y se presenta al sistema inmune. Como el sistema inmune no ha sido expuesto previamente al péptido críptico w, el sistema inmune considera el péptido w como no propio, e inicia una reacción inmune. Sin limitarse a la teoría, este fenómeno puede explicar la inmunogenicidad mejorada de la proteína truncada de acuerdo con la invención en comparación con la proteína nativa.

Los inventores han demostrado además que la estructura de nudo de cistina es importante para las propiedades inmunológicas de la proteína. Esto es especialmente válido, si la proteína nativa debe ser imitada inmunológicamente. Los inventores han demostrado, por ejemplo, que una proteína VEGF truncada en la que se bloquearon las cisteínas, desactivando la formación del nudo de cistina, no se reconoce por el anticuerpo monoclonal terapéutico VEGF Bevacizumab, mientras que se reconoce por dicho anticuerpo un VEGF truncado en el que se presenta un nudo de cistina. Es claro que lo que se dice anteriormente para VEGF es igualmente bien válido para otros miembros de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina. Si por ejemplo se usa un mímico de proteína de FSH, la actividad biológica u hormonal es insignificante, mientras que el mímico de proteína es capaz de inducir anticuerpos, preferentemente anticuerpos neutralizantes que son capaces de presentar reacción cruzada con la proteína nativa. Lo mismo tiene aplicación válida para otros miembros de la subfamilia GLHA /GLHB o miembros de otras subfamilias.

Una "proteína truncada con nudo de cistina" se define en la presente descripción como una proteína con nudo de cistina, en la que al menos parte de la secuencia de aminoácidos nativa se ha eliminado, preferentemente N-terminal y/o C-terminal de la secuencia de nudo de cistina. Con mayor preferencia, se han eliminado completamente las secuencias de aminoácidos N-terminal de C1 y C-terminal de C6. En una modalidad preferida, por lo tanto, la invención proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho mímico de proteína tiene el motivo C1-X1-C2-X2-C3-X3-C4-X4-C5-X5-C6. Preferentemente, C2, C3, C5 y C6 forman un anillo por un enlace entre C2 y C5, y entre C3 y C6, y un tercer enlace entre C1 y C4 penetra el anillo, formando así un nudo de cistina. En una modalidad más preferida, se proporciona un peptidomimético de acuerdo con la invención, para lo cual el número total de aminoácidos igual a 130 o menos, preferentemente 110 o menos, con mayor preferencia 100 o menos, aún con mayor preferencia 90 o menos, con la máxima preferencia 80 o menos de manera que la actividad biológica por ejemplo los efectos secundarios hormonales se reducen significativamente.

En una modalidad preferida, se proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde X1 representa una secuencia de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de

5 secuencia con una secuencia de aminoácidos de un miembro de superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina y en donde X2, X3 y/o X4 representan una secuencia de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de al menos otro miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina. Esto se llama un mímico de proteína quimérica porque el mímico de proteína contiene secuencias de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con las secuencias de al menos dos miembros diferentes de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina. Un mímico de proteína quimérica de ese tipo de acuerdo con la invención comprende preferentemente bucles, al menos uno de los cuales representan un bucle de otro miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina de los otros bucles. En una modalidad preferida, cada uno de dichos bucles representa otro miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina. En otra modalidad preferida, la invención proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho mímico de proteína comprende el motivo C1-X1-C2-X2-C3-X3-C4-X4-C5-X5-C6, en donde cada uno de dicho X1, X2, X3, X4 y X5 representa una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferentemente al menos 85%, con mayor preferencia al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con la parte correspondiente de una secuencia seleccionada de cualquiera de las secuencias 1 a 145 de la Figura 10. En una modalidad más preferida, cada uno de dichos X1, X2, X3, X4 y X5 representa una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la parte correspondiente de una secuencia seleccionada de las secuencias 1 a 145 de la Figura 10.

20 Es especialmente útil sustituir al menos un bucle de un miembro de una superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina con un bucle de otro miembro de una superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, en donde el último bucle es más pequeño, es decir, comprende los aminoácidos menores, que el bucle que se sustituye. Una de las ventajas de una sustitución con un bucle más pequeño es que se fabrica más fácilmente el mímico de proteína. En un ejemplo de trabajo de la invención, por ejemplo, se muestra que la sustitución del bucle b2 (representado por "X3") del Factor de Crecimiento Transformante-B2 (TGFB2) consistente de 29 aminoácidos con el bucle b2 de VEGF consistente de 6 aminoácidos proporciona un mímico de proteína que se usa con éxito para inducir anticuerpos que presentan reacción cruzada completamente con la proteína completa TGFB2. En una modalidad preferida, por lo tanto, la invención proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde X3 representa una secuencia de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina y en donde X1, X2 y/o X4 representan una secuencia de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de al menos otro miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, preferentemente en donde al menos dicho otro miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia de TGF-beta, con mayor preferencia TGFB2. Preferentemente X1, X2 y X4 representan cada uno una secuencia de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido de la parte correspondiente de la misma superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina mientras que X3 representa una secuencia de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de la parte correspondiente de otro miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina. Preferentemente X1, X2 y X4 representan una secuencia de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de un miembro de la subfamilia de TGF-beta, con mayor preferencia con una secuencia de aminoácidos de TGFB2. En una modalidad más preferida, el mímico de proteína quimérica consiste de la secuencia de aminoácidos: C1ALRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFC2AGAC3NDEGLEC4VSQDLEP LTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSC5KC6 (TGFB2₁₅₋₁₁₁/Δ₄₉₋₇₇-VEGF₆₂₋₆₇), que comprende opcionalmente secuencias de flaqueo con una longitud de como máximo 5 aminoácidos. En una modalidad preferida, las secuencias de flaqueo tienen una longitud de como máximo 2 aminoácidos, preferentemente como máximo 1 aminoácido. En una modalidad más preferida, el mímico de proteína no comprende secuencias de flaqueo.

50 TGFB2 es un miembro de la superfamilia de TGF-beta. Es una proteína secretada (citocina) que realiza muchas funciones celulares y tiene un papel vital durante el desarrollo embrionario. Se conoce además como factor de supresión de células T derivado de Glioblastoma, G-TSF, inhibidor de crecimiento celular BSC-1, Polyergin, y Cetermin. Se conoce que suprime los efectos de tumores de células T dependientes de interleucina.

55 En otra modalidad preferida, la descripción proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde X0 representa acetilo y/o X6 representa amida. En un aspecto más preferido, X0 representa acetilo y X6 representa amida. La acetilación del N-terminal y/o amidación del extremo C-terminal tiene varias ventajas, por ejemplo los extremos de péptidos acetilados y amidados no se cargan de manera que imitan péptidos naturales, la estabilidad hacia digestiones por aminopeptidasas se mejora y los extremos de péptidos se bloquean contra las actividades sintetasa.

60 En otra modalidad preferida, la invención proporciona un mímico de proteína de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, siendo capaz dicho mímico de proteína de inducir una respuesta inmune contra dicho miembro y que tiene una secuencia idéntica a dicho miembro, con la excepción de que la proteína se trunca en la posición 0 a 10, preferentemente en la posición 0 a 5, con mayor preferencia en la posición 0 a 3, aún con mayor

preferencia en la posición 0 a 2, con la máxima preferencia en la posición 0 o 1 N-terminal de C1 y en la posición 0 a 10, preferentemente en la posición 0 a 5, con mayor preferencia en la posición 0 a 3, aún con mayor preferencia en la posición 0 a 2, con mayor preferencia en la posición 0 o 1, con la máxima preferencia en la posición 0 C-terminal de C6 y en donde al menos una cisteína en cualquiera de las secuencias representadas por X1, X2, X3, X4 y X6 se sustituye por otro residuo de aminoácido.

En lugar de la secuencia nativa de un miembro dado, las secuencias de consenso de una subfamilia se pueden usar para diseñar un mimico de proteína útil en la invención.

Para la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, varias secuencias de consenso se han descrito ^(ref 1,3). Por ejemplo, para todas las proteínas con nudo de cistina de tipo Noggin, Coagulina y NGF, X2 consiste de 2 o 3 aminoácidos que se pueden definir como X2a-G-X2b, en donde X2a es cualquier aminoácido o ninguno, G es glicina, y X2b es cualquier aminoácido. En una modalidad preferida, por lo tanto, se proporciona un mimico de proteína de acuerdo con la invención, en donde X2 tiene la secuencia de aminoácidos X2a-G-X2b, en donde X2a es cualquier aminoácido o ninguno, G es glicina, y X2b es cualquier aminoácido. Otras secuencias consenso se conocen por ejemplo, para TGF-beta, GLHB, NGF, PDGF, GLHA, y CTCK. Las secuencias consenso conocidas se representan para las respectivas subfamilias en la Figura 10. En otra modalidad preferida, un mimico de proteína de acuerdo con la invención se proporciona, que comprende al menos una de las siguientes secuencias consenso:

- [GSRE]C3[KRL]G[LIVT][DE]XXX[YW]XSXC4;
- P[PSR]CVXXXRC2[GSTA]GCC3;
- [LIVM]XXPXX[FY]XXXC2XGXC3;
- C2[STAGM]G[HFYL]C3X[ST];
- [PA]VAXXC5XC6XXCXXX[STDAI][DEY]C;
- C2XGCC3[FY]S[RQS]A[FY]PTP; o
- CC4(X)13C(X)2[GN](X)12C5XC6(X)2,4C;

en donde

C2 a C6 son residuos de cisteína que son parte de una estructura de nudo de cistina ;

X significa cualquier aminoácido;

[GSRE] significa G o S o R o E ; [KRL] significa K o R o L;

[LIVT] significa L o I o V o T; [DE] significa D o E ; [YW] significa Y o W;

[PSR] significa P o S o R; [GSTA] significa G o S o T o A;

[LIVM] significa L o I o V o M ; [FY] significa F o Y ;

[STAGM] significa S o T o A o G o M; [HFYL] significa H o F o Y o L;

[ST] significa S o T; [PA] significa P o A; [STDAI] significa S o T o D o A o I;

[DEY] significa D o E o Y; [GN] significa G o N ; [RQS] significa R o Q o S;

(X) 13 significa una secuencia de 13 aminoácidos; (X) 2 significa una secuencia de 2 aminoácidos; (X) 12 significa una secuencia de 12 aminoácidos y (X) 2,4 significa una secuencia de 2, 3 o 4 aminoácidos.

Se prefiere usar un mimico de proteína, que muestra un considerable % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos nativa de dicha proteína con nudo de cistina, para producir anticuerpos y/o células T que son capaces de presentar reacción cruzada hacia la proteína nativa. Con considerablemente % de identidad de secuencia se entiende: al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos nativa de dicha proteína con nudo de cistina. Esto es especialmente válido si el mimico de proteína se usa como una vacuna para inducir una respuesta inmune que presenta reacción cruzada con una proteína nativa con nudo de cistina, pero además si el mimico de proteína se usa para inducir las células T y/o los anticuerpos que se usan como un medicamento. Las células T y/o anticuerpos que se elevan contra el mimico de proteína son especialmente útiles si son capaces de presentar reacción cruzada con una proteína nativa con nudo de cistina. "% de identidad de secuencia" se define en la presente descripción como el porcentaje de residuos en una secuencia de aminoácidos candidata que es idéntico con los residuos en una secuencia de referencia después de alinear las dos secuencias e introducir interrupciones, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad. Los métodos y programas informáticos para el alineamiento se conocen bien en la técnica. Un programa de computadora que se puede usar o adaptar para los propósitos de determinar si una secuencia candidata cae dentro de esta definición es "Align 2", escrito por Genentech, Inc. que se presentó con la documentación de usuario en la Oficina de Copyright de Estados Unidos, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991.

En una modalidad preferida, se proporciona un mimico de proteína de acuerdo con la invención, en donde el mimico de proteína tiene una secuencia de aminoácido con al menos 90% de identidad de secuencia con la correspondiente secuencia de aminoácido nativa de dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina. En otra modalidad preferida, la invención proporciona un mimico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro seleccionado del grupo que consiste de la subfamilia GLHB, la subfamilia PDGF, la subfamilia TGF-beta, la subfamilia NGF, la subfamilia GLHA, la

subfamilia CTCK, la subfamilia tipo Noggin, la subfamilia tipo Mucina, la subfamilia antagonista BMP tipo Mucina, la subfamilia hemolectina tipo Mucina, la subfamilia tipo Hendidura, y la subfamilia tipo Jagged.

5 Es útil además diseñar un mimico de proteína de acuerdo con la invención con al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos nativa correspondiente de dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, en donde al menos una de las secuencias de aminoácidos representada por X1, X3 o X4 se elimina al menos parcialmente y/o modifica. Esto es, por ejemplo, especialmente útil si dicha secuencia de aminoácidos comprende un péptido inmunodominante, o si dicha secuencia de aminoácidos no tiene ninguna función, por ejemplo, si dicha secuencia no es parte del determinante inmunogénico de dicho miembro. La delección de una
10 secuencia de aminoácidos de ese tipo puede, por ejemplo, facilitar considerablemente el proceso de fabricación, reducir los costos de fabricación o mejorar la solubilidad del mimico de proteína de acuerdo con la invención. En una modalidad preferida, por lo tanto, la invención proporciona un mimico de proteína de acuerdo con la invención, en donde al menos una de las secuencias de aminoácidos representadas por X1, X3 o X4 se suprime al menos parcialmente y/o modifica.

15 Por ejemplo el PDGF juega un papel en el desarrollo embrionario, proliferación celular, migración celular y angiogénesis. PDGF se ha relacionado además con varias enfermedades tales como aterosclerosis, fibrosis y enfermedades malignas. Especialmente la familia VEGF, una sub-subfamilia de la subfamilia de PDGF se ha asociado con la angiogénesis relacionada con el crecimiento tumoral y la metástasis. En consecuencia, en una modalidad preferida, la invención proporciona un mimico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro es un miembro de
20 la subfamilia de PDGF, y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 3 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 29 a 32 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácido con una longitud de 6 a 12 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 32 a 41 aminoácidos.

25 En una modalidad más preferida, se proporciona un mimico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro es el Factor de Crecimiento Endotelial Vasculoso humano (hVEGF), y en donde X0 comprende la secuencia de aminoácidos KFMDVYQRSY, X1 comprende la secuencia de aminoácidos HPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSAVPLMR, X2 comprende GGA, X3 comprende NDEGLE, X4 comprende VPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNC, X5 comprende E, y X6 comprende RPKKDRARQE. En otro aspecto, se proporciona un mimico de proteína que tiene al
30 menos 90% de identidad de secuencia con X0-X6 de hVEGF, en donde X0-X6 son las respectivas secuencias de aminoácidos del hVEGF representados en la Figura 10. Preferentemente dicho mimico de proteína tiene al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con X0-X6 de hVEGF. Todavía en otra modalidad más preferida, se proporciona un mimico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro es el Factor de Crecimiento Endotelial Vasculoso Humano (hVEGF), y en donde dicho mimico de proteína consiste de la secuencia de
35 aminoácidos C1HPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSAVPLMRC2GGAC3NDEGLEC4VPTEES NITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNC5EC6, que comprende opcionalmente secuencias de flaqueo con una longitud de como máximo 5 aminoácidos. En una modalidad preferida, las secuencias de flaqueo tienen una longitud de como máximo 2 aminoácidos, preferentemente como máximo 1 aminoácido. En una modalidad más preferida, el mimico de proteína no comprende secuencias de flaqueo.

40 **El Factor de crecimiento placentario (PLGF)** es un miembro de la subfamilia de PDGF (subfamilia 4) y una molécula clave en la angiogénesis y vasculogénesis, particularmente, durante la embriogénesis. La principal fuente de PLGF durante el embarazo es el trofoblasto placentario. El PLGF se expresa además en muchos otros tejidos, que incluyen el trofoblasto vellosos. La expresión de PLGF dentro de las lesiones ateroscleróticas humanas se asocia con la inflamación
45 de la placa y el crecimiento neovascular. Los niveles en el suero de PLGF y sFlt-1 (tirosina quinasa-1 similar a fms soluble, conocido además como receptor-1 del VEGF soluble) se alteran en las mujeres con preeclampsia. Los estudios muestran que tanto en la preeclampsia de aparición temprana como tardía, los niveles en el suero materno de sFlt-1 son más altos y PLGF menor en las mujeres que se presentan con preeclampsia. Adicionalmente, los niveles en la placenta de sFlt-1 se aumentaron significativamente y PIGF disminuyó en las mujeres con preeclampsia en comparación con aquellos con embarazos sin complicaciones. Esto sugiere que las concentraciones en la placenta de sFlt-1 y PLGF reflejan los cambios del suero materno. Esto es consistente con la idea de que la placenta es la principal fuente de sFlt-1 y PLGF durante el embarazo.

55 Todavía en otra modalidad más preferida, se proporciona un mimico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro es el Factor de Crecimiento Placentario humano (hPLGF), y en donde X0 comprende la secuencia de aminoácidos PFQEVWGRSY, X1 comprende la secuencia de aminoácidos RALERLVDVVSEYPSVEHMFSPSAVSLLR, X2 comprende TGA, X3 comprende GDENLH, X4 comprende VPVETANVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQHVR, X5 comprende E, y X6 comprende RHSPGRQSPD. En otro aspecto más preferido, se proporciona un mimico de proteína que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con X0-X6 de
60 PLGF, en donde X0-X6 son las respectivas secuencias de aminoácidos de PLGF representadas en la Figura 10. Preferentemente dicho mimico de proteína tiene al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con X0-X6 de PLGF. Todavía en otra modalidad preferida, se proporciona un mimico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro es el Factor de Crecimiento Placentario humano (hPLGF), y en

5 donde dicho mímico de proteína C1RALERLVDVSEYPSEVEHMFSPSAVSLLR2TGAC3GDENLHC4VPVETA NVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQHVRC5EC6 (hPLGF₃₄₋₁₁₂) que comprende opcionalmente secuencias de flanqueo con una longitud de como máximo 5 aminoácidos. En una modalidad preferida, las secuencias de flanqueo tienen una longitud de como máximo 2 aminoácidos, preferentemente como máximo 1 aminoácido. En una modalidad más preferida, el mímico de proteína no comprende secuencias de flanqueo.

10 Todavía en otra modalidad preferida se proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro es el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas A humano (hPDGF-A), y en donde X0 comprende la secuencia de aminoácidos SIEEAVPAV, X1 comprende la secuencia de aminoácidos KTRTVIYEIPRSQVDPTSANFLIWPPCVEVKR, X2 comprende TGC, X3 comprende NTSSVK, X4 comprende QPSRVHHRSVKVAKVEYVRKKPKLKEVQVRLEEHL, X5 comprende A, y X6 comprende ATSLNPDYRE. En otro aspecto más preferido, se proporciona un mímico de proteína que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con X0-X6 de hPDGF-A, en donde X0-X6 son las respectivas secuencias de aminoácidos de hPDGF-A representadas en la Figura 10. Preferentemente dicho mímico de proteína tiene al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con X0-X6 de hPDGF-A.

20 Todavía en otra modalidad preferida se proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro es el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas A humano (hPDGF-C), y en donde X0 comprende la secuencia de aminoácidos LLTEEVRLYS, X1 comprende la secuencia de aminoácidos TPRNFSVSIREELKRTDTIFWPGCLLVKR, X2 comprende GGN, X3 comprende ACCLHNCNECQ, X4 comprende VPSKVTKKYHEVLQLRPKTGVRGLHKS LTDVALEHHEE, X5 comprende D, y X6 comprende VCRGSTGG. En otro aspecto más preferido, se proporciona un mímico de proteína que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con X0-X6 de hPDGF-C, en donde X0-X6 son las respectivas secuencias de aminoácidos de hPDGF-C representadas en la Figura 10. Preferentemente dicho mímico de proteína tiene al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con X0-X6 de hPDGF-C.

30 Todavía en otra modalidad más preferida, se proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro es el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular humano C (hVEGF-C), y en donde X0 comprende la secuencia de aminoácidos SIDNEWRKTQ, X1 comprende la secuencia de aminoácidos MPREVAIDVGKEFGVATNTFFKPPCVSVYR, X2 comprende GGC, X3 comprende PDDGLE, X4 comprende VPTGQHQVRMQLMIRYPSSQLGEMSLEEHSQ, X5 comprende E, y X6 comprende RPKKKDSAVK. En otro aspecto más preferido, se proporciona un mímico de proteína que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con X0-X6 de hVEGF-C, en donde X0-X6 son las respectivas secuencias de aminoácidos de hVEGF-C representadas en la Figura 10. Preferentemente dicho mímico de proteína tiene al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con X0-X6 de hVEGF-C.

40 Otras subfamilias de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina incluyen la subfamilia GLHA y GLHB. Los miembros de dichas subfamilias comprenden las subunidades de la hormona de glicoproteína alfa y hormona de glicoproteína beta, respectivamente, que después de la dimerización forma la hormona luteinizante, (LH), hormona estimulante de tiroides (TSH), gonadotropina coriónica (CG) y la hormona estimulante del foliculo (FSH). Estas hormonas juegan un papel en la reproducción en los mamíferos. Por ejemplo FSH estimula las funciones testiculares y ováricas a través de la unión a un G receptor-acoplado a la proteína G ya sea en las células Sertoli (masculino) o granulosa (hembra). Entre otras cosas, la LH estimula la ovulación y sostiene el cuerpo lúteo durante el ciclo menstrual, mientras que CG, por ejemplo, sostiene el cuerpo lúteo durante el embarazo. La TSH es importante para la maduración de las células Sertoli y la función ovulatoria. La presente invención proporciona además mímicos de proteínas de esta subfamilia GLHB.

50 Así, en otra modalidad preferida, dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la familia GLHB, X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 3 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 23 a 28 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 18 a 20 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 30 a 33 aminoácidos.

55 En una modalidad más preferida, se proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro es la Hormona Foliculo Estimulante humana (hFSH), y en donde X0 comprende la secuencia de aminoácidos NS, X1 comprende la secuencia de aminoácidos ELTNITIAIEKEECRFCISINTTW, X2 comprende AGY, X3 comprende YTRDLVYKDPARPKIQKT, X4 comprende TFKELVYETVRVPGCAHADS LYTPVATQ, X5 comprende H, y X6 comprende KCDSSTDCT. En otro aspecto más preferido, se proporciona un mímico de proteína que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con X0-X6 de FSH, en donde X0-X6 son las respectivas secuencias de aminoácidos de FSH representadas en la Figura 10. Preferentemente dicho mímico de proteína tiene al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con X0-X6 de FSH.

Todavía en otra modalidad preferida se proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde

5 dicho miembro es la Coriagonadotropina humana (hCG), y en donde X0 comprende la secuencia de aminoácidos SKEPLRPR, X1 comprende secuencia de aminoácidos RPINATLAVEKEGCPVCITVNTTI, X2 comprende AGY, X3 comprende PTMTRVLQGVLPALPQVV, X4 comprende NYRDVRFESIRLPGCPRGVNPVVSVAVALS, X5 comprende Q, y X6 comprende ALCRRSTTDC. En otro aspecto más preferido, se proporciona un mímico de proteína que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con X0-X6 de hCG, en donde X0-X6 de hCG son las respectivas secuencias de aminoácidos representadas en la Figura 10. Preferentemente dicho mímico de proteína tiene al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con X0-X6 de hCG.

10 Todavía en otra modalidad preferida, la invención proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia de la hormona de glicoproteína -alfa (GLHA), y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 3 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 13 a 17 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 27 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 20 a 21 aminoácidos.

20 Todavía en otra modalidad preferida, la invención proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia del factor de crecimiento nervioso (NGF), y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 9 a 24 aminoácidos, X5 representa secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 41 a 44 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 11 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 27 o 28 aminoácidos. En una modalidad más preferida, se proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro es el Factor de Crecimiento Nervioso humano (hNGF), y en donde X0 comprende la secuencia de aminoácidos PIFHRGEFSV, X1 comprende la secuencia de aminoácidos DSVSVVVGDKTTATDIKIGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETK, X2 comprende RDPNPVDSG, X3 comprende RGIDSKHWNSY, X4 comprende TTTHTFVKALTMGKQAAWRFIRIDTA, X5 comprende V, y X6 comprende VLSRKAVRRA. En otro aspecto más preferido, se proporciona un mímico de proteína que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con X0-X6 de hNGF, en donde X0-X6 son las respectivas secuencias de aminoácidos de hNGF representadas en la Figura 10. Preferentemente dicho mímico de proteína tiene al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con X0-X6 de hNGF.

35 Los miembros de la subfamilia NGF juegan un papel en la supervivencia y mantenimiento de las neuronas simpáticas y sensoriales y se han asociado con la enfermedad de Alzheimer. NGF desempeña un papel en la reparación, regeneración, y protección de las neuronas, y un mímico de proteína de un miembro de la subfamilia de NGF de acuerdo con la invención es así especialmente útil para tratar o prevenir un trastorno neurodegenerativo.

40 Todavía otra subfamilia de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es la subfamilia TGF-beta. El TGF-beta controla la proliferación, diferenciación celular, y otras funciones en la mayoría de las células. Juega un papel en la inmunidad, cáncer, enfermedad del corazón y en el síndrome de Marfan, un trastorno genético del tejido conectivo.

45 En otra modalidad preferida, por lo tanto, la invención proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento cistina-nudo es un miembro de la subfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 3 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 23 a 41 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 18 a 36 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 27 a 34 aminoácidos.

50 En una modalidad más preferida, se proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro es el Factor de crecimiento transformante humano beta2 (hTGF-beta2), y en donde X0 comprende la secuencia de aminoácidos CLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANF, X2 comprende AGA, X3 comprende PYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASASPC, X4 comprende VSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKS, X5 comprende K, y X6 comprende S. En otro aspecto más preferido, se proporciona un mímico de proteína que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con X0-X6 de hTGF-beta2, en donde X0-X6 son las respectivas secuencias de aminoácidos hTGF-beta2 representadas en la Figura 10. Preferentemente dicho mímico de proteína tiene al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con X0-X6 de hTGFbeta2.

60 Diversas proteínas modulares funcionales comparten un dominio conservado de aproximadamente 90 aminoácidos en su región C-terminal rica en cisteína, que se ha propuesto que sea estructuralmente relacionada con la familia con nudo de cistina y que por lo tanto se llama nudo de cistina C-terminal (CTCK). Los miembros de la familia con nudo de cistina C-terminal son, entre otros, el factor de von Willebrand (vWF), una proteína multifuncional que se implica en el mantenimiento de la homeostasis, mucinas, miembros de la familia CCN (familia de proteínas cef-10/cyr61/CTFG/fisp-

12/nov)^(ref 5), proteína de la hendidura de *Drosophila*, que es esencial para el desarrollo de la glía de la línea media y las vías de axones comisurales, proteína de la enfermedad de Norrie (NPD), que puede estar implicada en la interacción célula-célula neuroectodérmica y en una vía que regula la diferenciación y la proliferación celular neuronal, y hemocitina de polilla de seda, una lectina humoral que se implica en un mecanismo de auto-defensa. La enseñanza de la presente invención abarca además esta familia CTCK.

En otra modalidad preferida, por lo tanto, la invención proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia CTCK y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 2 a 3 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 22 a 35 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 4 a 28 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 29 a 41 aminoácidos.

Esclerostina (o SOST) es un miembro además de la subfamilia CTCK de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina. La esclerostina, el producto del gen SOST, se creyó originalmente que era un antagonista de la proteína morfogenética ósea no clásica (BMP). Más recientemente, la Esclerostina se ha identificado como que se une a receptores LRP5/6 y que inhibe la vía de señalización Wnt. La activación Wnt bajo estas circunstancias es antagónica a la formación de hueso. Más recientemente, se ha revelado que el antagonismo de la formación ósea inducida con BMP por esclerostina se media por la señalización de Wnt, pero no las vías de señalización de BMP. La síntesis exitosa de SOST⁶⁷⁻¹⁴⁴ en uno de los ejemplos sirven para demostrar que las proteínas/péptidos truncados con nudos de cistina con un puente adicional SS entre C₇₁ (bucle-1; X1) y C₁₂₅ (bucle-3; X4) forman perfectamente la estructura nudo de cistina plegada correctamente en presencia del enlace disulfuro adicional

En una modalidad más preferida, se proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro es esclerostina, y en donde X0 comprende la secuencia de aminoácidos FETKDVSEYS, en donde X1 comprende la secuencia de aminoácidos RELHFTRYVTDGPCRSKPVTELV, X2 comprende SGQ, X3 comprende GPARLLPNAIGRGKWWRPSGPDFR, X4 comprende IPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVAS, X5 comprende K, y X6 comprende KRLTRFHNQS. En otro aspecto más preferido, se proporciona un mímico de proteína que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con X0-X6 de esclerostina, en donde X0-X6 son las respectivas secuencias de aminoácidos de esclerostina representadas en la Figura 10. Preferentemente dicho mímico de proteína tiene al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con X0-X6 de esclerostina. Todavía en otra modalidad más preferida se proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro es esclerostina, y en donde dicho mímico de proteína consiste de la secuencia de aminoácidos GGGC1RELHFTRYVTDGPCRSKPVTELV2SGQC3GPARLLPNAIGRGKWW RPSGPDFRC4IPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVASC5KC6, que comprende opcionalmente secuencias de flanco con una longitud de como máximo 5 aminoácidos. En una modalidad preferida, las secuencias de flanco tienen una longitud de como máximo 2 aminoácidos, preferentemente como máximo 1 aminoácido. En una modalidad más preferida, el mímico de proteína no comprende secuencias de flanco.

Los miembros de la subfamilia tipo Noggin son por ejemplo conocidos por inhibir la transducción de la señal de TGF-beta por su unión a ligandos de la familia del TGF-beta y su prevención a partir de la unión a sus correspondientes receptores. Noggin juega un papel clave en la inducción neural mediante la inhibición de BMP4. Un mímico de proteína de un miembro de la subfamilia tipo Noggin así es especialmente útil para la regulación de TGF-beta y/o actividad de BMP4.

En otra modalidad preferida, por lo tanto, la invención proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia tipo Noggin y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 4 a 6 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 22 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 7 a 9 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 35 a 98 aminoácidos.

Un mímico de proteína de un miembro de la subfamilia tipo Coagulina es por ejemplo especialmente útil para el tratamiento de trastornos de la coagulación. Los ensayos clínicos se han iniciado, por ejemplo, con terapia génica basada en suplementación de coagulina B para la hemofilia B. Sin embargo, un mímico de proteína de un miembro de la subfamilia tipo coagulina proporcionado con la presente es adecuado para inhibir la coagulina B, por ejemplo para reducir la coagulación de sangre, evitando de ese modo la trombosis.

En otra modalidad preferida, por lo tanto, la invención proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia tipo Coagulina y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 7 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de

aminoácidos con una longitud de 38 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 5 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 29 aminoácidos.

5 Los miembros de la subfamilia-tipo jagged son, por ejemplo ligandos de la familia de receptores Notch. La vía de señalización Notch juega un papel crucial durante la formación del patrón embrionario, controla muchos eventos de determinación de células conservadas y define un mecanismo fundamental que controla el destino celular. Se involucra en las decisiones de linaje de células en una variedad de tejidos. Juega un papel en la hematopoyesis, desarrollo vascular y angiogénesis, miogénesis, neurogénesis, somitogénesis, desarrollo de los riñones, ojos, oídos, y dientes etc. Los mímicos de proteínas basados en los miembros tipo jagged son especialmente útiles para controlar los procesos biológicos antes mencionados.

10 En otra modalidad preferida, por lo tanto, la invención proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia tipo jagged y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 3 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 32 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 25 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 26 aminoácidos.

15 Como se dijo antes, la Figura 10 representa ejemplos no limitantes de proteínas truncadas pertenecientes a varias subfamilias de factores de crecimiento con nudos de cistina. Es especialmente útil introducir mutaciones pequeñas, por ejemplo intercambiar al menos una cisteína, no siendo una de las cisteínas conservadas 1 a 6, que son necesarias para la formación de nudo de cistina, para evitar por ejemplo la formación de dímero. En una modalidad preferida, por lo tanto, se proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho X1 representa una secuencia de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias identificadas como X1 en la Figura 10, y/o en donde dicho X3 representa una secuencia de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias identificadas como X3 en la Figura 10, y/o en donde dicho X4 representa una secuencia de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias identificadas como X4 en la Figura 10, en donde X1, X3 y X4 se toman de una única secuencia de aminoácidos de la Figura 10. Al menos una cisteína en cualquiera de las secuencias representadas por X1, X2, X3, X4, y X6, se sustituye por otro aminoácido, preferentemente alanina. En otra modalidad preferida, dicho X1 representa una secuencia de aminoácidos que es idéntica con cualquiera de las secuencias identificadas como X1 en la Figura 10, y/o X3 representa una secuencia de aminoácidos que es idéntica con cualquiera de las secuencias identificadas como X3 en la Figura 10, y/o X4 representa una secuencia de aminoácidos que es idéntica a cualquiera de las secuencias identificadas como X4 en la Figura 10, en donde X1, X3 y X4 se toman de a partir de una única secuencia de aminoácidos de la Figura 10.

20 En otra modalidad preferida, se proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho X2 representa una secuencia de aminoácidos con al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias identificadas como X2 en la Figura 10, y/o en donde X5 representa una secuencia de aminoácidos que es idéntica a cualquiera de las secuencias identificadas como X5 en la Figura 10, en donde X2 y X5 se toman de una única secuencia de aminoácidos de la Figura 10. Al menos una cisteína en cualquiera de las secuencias representadas por X1, X2, X3, X4, y X6, se sustituye por otro aminoácido, preferentemente alanina. En otra modalidad más preferida, dicho X2 representa una secuencia de aminoácidos que es idéntica con una secuencia identificada como X2 en la Figura 10, en donde X2 y X5 se toman de una única secuencia de aminoácidos de la Figura 10.

25 En otra modalidad preferida, la invención proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho mímico de proteína comprende el motivo C1-X1-C2-X2-C3-X3-C4-X4-C5-X5-C6, en donde dicha secuencia de aminoácidos tiene al menos 80%, preferentemente al menos 85%, con mayor preferencia al menos 90%, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada a partir de las secuencias 1 a 145 de la Figura 10. En un aspecto más preferido, dicha secuencia de mímico de proteína es idéntica a una secuencia seleccionada a partir de las secuencias 1 a 145 de la Figura 10. Un mímico de proteína de ese tipo es especialmente útil para la inducción de una reacción cruzada, preferentemente una respuesta de anticuerpo neutralizante debido a que el mímico de proteína es idéntico a una parte de la proteína nativa.

30 En una modalidad preferida, se proporciona un mímico de proteína de acuerdo con la invención, en donde dicho C1 se enlaza a C4 a través de un enlace disulfuro y/o C2 se enlaza a C5 a través de un enlace disulfuro, y/o C3 se enlaza a C6 a través de un enlace disulfuro. En una modalidad más preferida, C1 se enlaza a C4 a través de un enlace disulfuro y C2 se enlaza a C5 a través de un enlace disulfuro, y C3 se enlaza a C6 a través de un enlace disulfuro.

Ahora que la invención proporciona mímicos de proteínas de los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, la invención proporciona además la idea de que un mímico de proteína de acuerdo con la invención

es especialmente útil para inducir una respuesta inmune, dicha respuesta inmune es la reacción cruzada con un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina.

5 Con "reacción cruzada" se entiende que el anticuerpo producido no solamente se une específicamente al mímico de proteína contra la cual se elevó el anticuerpo, sino además se une específicamente a al menos uno de dichos miembros de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina-nudo. En modalidad, por lo tanto, se proporciona una composición inmunogénica, que comprende un mímico de proteína de acuerdo con la invención. Dicha composición inmunogénica comprende además un portador terapéuticamente aceptable, adyuvante, diluyente y/o excipiente. "Composición inmunogénica" se define en la presente descripción en su sentido más amplio para referir a cualquier tipo de agente biológico en una forma administrable capaz de inducir y/o estimular una respuesta inmune en un animal. En una modalidad preferida, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención comprende al menos un mímico de proteína de acuerdo con la invención y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

10 En otra modalidad preferida, se proporciona una composición inmunogénica de acuerdo con la invención, en donde dicho mímico de proteína se acopla con un portador inmunogénico, preferentemente toxina de la difteria (DT) y/o hemocianina de lapa californiana (KLH).

15 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un mímico de proteína de acuerdo con la invención y un portador farmacéuticamente aceptable, diluyente y/o excipiente. Adecuados portadores, diluyentes, excipientes y similares se conocen comúnmente en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden encontrar fácilmente y aplicar por el técnico con experiencia, referencias por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Filadelfia PA, 17ma ed. 1985.

20 Los miembros de la super-familia del factor de crecimiento con nudo de cistina se asocian, como ya se mencionó antes, con muchas enfermedades, que incluyen enfermedades del sistema nervioso, desarrollo hematopoyético, trastornos de la coagulación, cáncer, angiogénesis, etc. En una modalidad, por lo tanto, la invención proporciona un uso de un mímico de proteína de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento y/o agente profiláctico para el tratamiento y/o prevención de un trastorno asociado con un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina.

25 Así, la descripción proporciona el uso de un mímico de proteína en una composición inmunogénica. Tal composición inmunogénica que comprende un mímico de proteína de acuerdo con la invención es adecuada para inducir una reacción inmune en un animal, preferentemente un humano. En un aspecto preferido, un mímico de proteína de la invención se usa para inducir anticuerpos, que son capaces de presentar reacción cruzada con la proteína nativa. Aún con mayor preferencia dichos anticuerpos son anticuerpos neutralizantes, es decir, la función y/o actividad de la proteína nativa con nudo de cistina se disminuye, inhibe, o al menos se reduce después de la unión de la proteína nativa con nudo de cistina a dicho anticuerpo neutralizante. Es posible inducir dichos anticuerpos en un individuo que lo necesita, por ejemplo por la administración de una vacuna que comprende un mímico de proteína de acuerdo con la invención a dicho individuo. Es posible además inducir dichos anticuerpos en un animal no humano por la administración de una composición inmunogénica de la invención a dicho animal y usar anticuerpos obtenidos a partir de dicho animal para la fabricación de un medicamento.

30 Ahora que la invención proporciona la idea de que un mímico de proteína de acuerdo con la invención es adecuado para elevar una respuesta inmune contra un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, se describe un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un mímico de proteína de acuerdo con la invención a un sujeto que sufre de, o en riesgo de sufrir, dicho trastorno.

35 Una subfamilia de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es la subfamilia de factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que es una subfamilia de la subfamilia de PDGF. Los VEGF actúan a través de una familia de receptores tirosina quinasas afines en las células endoteliales para estimular la formación de vasos sanguíneos. Mímicos de proteínas de, y/o anticuerpos específicos para VEGF así son especialmente útiles para tratar un trastorno relacionado con la vascularización. Uno de tales trastornos es la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), que causa la pérdida visual rápida y severa. Esta pérdida es debido al desarrollo de la neovascularización coroidea debajo de la mácula. La inhibición de VEGF es por lo tanto especialmente útil para el tratamiento y/o prevención de la AMD. Otro ejemplo de una enfermedad que se relaciona con la vascularización es cáncer. Los tumores necesitan neovascularización para crecer. El crecimiento rápido de tejido necesita un suministro continuo de oxígeno y nutrientes y, por lo tanto, se cree que sea la inhibición eficaz de la neovascularización una de las estrategias prometedoras para el tratamiento del cáncer. Esto se logra, por ejemplo, inhibiendo por ejemplo VEGF. Como se dijo antes, Avastin™, un anticuerpo monoclonal (Bevacizumab, Genentech) se aprobó en 2004 por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento del cáncer colorrectal cuando se usa con la quimioterapia estándar. En 2006, la FDA aprobó el Bevacizumab para el tratamiento de cáncer de pulmón en combinación con la terapia de combinación de primera línea estándar.

5 Los inconvenientes de Bevacizumab, tales como los altos costos de producción y las grandes cantidades relativas necesarias para el tratamiento, la penetración del tumor a veces baja y administración frecuente se reducen cuando se usa un mimico de proteína o una composición inmunogénica de la invención. Por ejemplo, una composición
 5 inmunogénica que comprende un mimico de proteína de la invención se administra en una dosis de unos pocos mg, preferentemente de 0.1 a 10 mg por sujeto para inducir una respuesta inmune. Una administración de ese tipo se repite generalmente dos o tres veces, para inducir una respuesta de protección apropiada.

10 En una modalidad, por lo tanto, la invención proporciona el uso de un mimico de proteína de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento y/o agente profiláctico para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad tumoral relacionada y/o la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), en donde dicho miembro del superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia VEGF o la subfamilia de TGF-beta.

15 Otra subfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, TGF-beta, también se relaciona con el cáncer. En las células normales, TGF-beta, actuando a través de su vía de señalización, detiene el ciclo celular en la fase G1 para detener la proliferación, inducir la diferenciación, o promover la apoptosis. Cuando una célula se transforma en una célula cancerosa, partes de la vía de señalización de TGF-beta se mutan, y el TGF-beta ya no controla la célula. Estas células cancerosas proliferan. El células estromales circundantes (fibroblastos) también proliferan. Ambas células
 20 aumentan su producción de TGF-beta. Este TGF-beta actúa sobre las células estromales, células inmunes, células endoteliales y de músculo liso circundantes. Causa inmunosupresión y angiogénesis, lo que hace el cáncer más invasivo. TGF-beta también convierte células T efectoras, que normalmente atacan el cáncer con una reacción inflamatoria (inmune), en células T reguladoras (supresoras), que a su vez cortan la reacción inflamatoria. Inhibir TGF-beta, por ejemplo, con un mimico proteína de acuerdo con la invención y/o un anticuerpo de la descripción o parte
 25 funcional y/o equivalente funcional de este de la descripción, en donde dicho miembro pertenece a la subfamilia del TGF-beta, es así especialmente útil para el tratamiento del cáncer.

30 En una modalidad preferida, por lo tanto, se proporciona un uso de acuerdo con la invención, en donde dicho trastorno comprende una enfermedad relacionada con el tumor y/o degeneración macular relacionada con la edad (AMD), y en donde dicho miembro del superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia VEGF o la subfamilia TGF-beta. En una modalidad más preferida, dicha enfermedad relacionada con el tumor es cáncer colorrectal o cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

35 En otro aspecto preferido, se proporciona un método de acuerdo con la descripción, en donde dicho trastorno comprende un trastorno del tejido conectivo, preferentemente síndrome de Marfan. El síndrome de Marfan es llevado por un gen llamado FBN1, que codifica una proteína conectiva llamada fibrilina-1. Las personas tienen un par de genes FBN1. Debido a que es dominante, las personas que han heredado un gen FBN1 afectado de cualquiera de los padres tendrá Marfan. Adicionalmente a ser una proteína conectiva que forma el soporte estructural para tejidos fuera de la célula, la fibrilina-1 se une a otra proteína, TGF-beta. TGF-beta puede causar inflamación. Los investigadores ahora creen que los efectos inflamatorios de TGF-beta, en los pulmones, válvulas del corazón, y aorta, debilitan los tejidos y causan las características del síndrome de Marfan. Un mimico de proteína de TGF-beta es así especialmente útil para el
 40 tratamiento del síndrome de Marfan.

45 En contraste, la neovascularización (regeneración vascular) es especialmente útil para el tratamiento de la enfermedad isquémica que incluyen pero sin limitarse a la oclusión arteriosclerótica de los miembros inferiores, angina de pecho/infarto de miocardio o infarto cerebral para rescatar el tejido isquémico mediante el desarrollo de la circulación colateral. En otro aspecto preferido, por lo tanto, dicho trastorno comprende un trastorno isquémico, preferentemente dicho trastorno isquémico se toma del grupo que consistente de oclusión arteriosclerótica de los miembros inferiores, angina de pecho, infarto de miocardio e infarto cerebral, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia de VEGF
 50

Como se dijo antes, los miembros de la subfamilia de NGF son críticos para la supervivencia y mantenimiento de las neuronas simpáticas y sensoriales y se han asociado con la enfermedad de Alzheimer. Como el NGF desempeña un papel en la reparación, regeneración, y protección de las neuronas, un mimico de proteína de un miembro de la subfamilia de NGF de acuerdo con la invención es así especialmente útil para tratar o prevenir un trastorno neurodegenerativo. Otras posibles aplicaciones son el uso de un mimico de proteína de un miembro de la subfamilia de NGF de acuerdo con la invención, por ejemplo a través inducción de anticuerpos específicos a NGF, para disminuir y/o tratar dolor crónico y/o neurodegenerativo. Además, tales anticuerpos específicos a NGF se consideran especialmente útiles para el tratamiento de tumores de mama, como se conoce el NGF es un fuerte estimulador de la proliferación de las células de cáncer de mama.
 55
 60

En otro aspecto preferido, por lo tanto, de acuerdo con la descripción se proporciona un método, en donde dicho trastorno comprende un trastorno seleccionado del grupo consistente de un trastorno neurodegenerativo,

preferentemente la enfermedad de Alzheimer, un trastorno de dolor, preferentemente un trastorno de dolor crónico y/o neuropático, y cáncer, preferentemente cáncer de mama. En una modalidad más preferida, se describe un método, en donde dicho miembro pertenece a la subfamilia de NGF.

5 Se proporciona además un método para producir anticuerpos contra un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, que comprende administrar un mímico de proteína de acuerdo con la invención y o una composición inmunogénica de acuerdo con la invención a un animal no humano, y obtener anticuerpos contra un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, por lo que los anticuerpos se producen por dicho animal. Se describe además el uso de un mímico de proteína de acuerdo con la invención en un método *ex vivo* para producir un anticuerpo, o una parte funcional o equivalente funcional de un anticuerpo, que se dirige específicamente contra un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina. El técnico con experiencia es consciente de los diferentes métodos para producir un anticuerpo *ex vivo*, tales como técnicas de hibridoma de células B, tecnologías de presentación de fagos de anticuerpo y similares.

15 Una parte funcional de un anticuerpo se define con la presente como una parte que tiene al menos una misma propiedad que dicho anticuerpo en clase, no necesariamente en cantidad. Dicha parte funcional es preferentemente capaz de unirse al mismo antígeno que dicho anticuerpo, aunque no necesariamente en la misma medida. Una parte funcional de un anticuerpo comprende preferentemente un anticuerpo de dominio sencillo, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fab o un fragmento F (ab')₂. Un equivalente funcional de un anticuerpo se define como un anticuerpo que se ha alterado de tal manera que al menos una propiedad - preferentemente una propiedad de unión al antígeno del compuesto resultante es esencialmente el mismo en clase, no necesariamente en cantidad. Se proporciona un equivalente de muchas formas, por ejemplo a través de la sustitución conservativa de aminoácidos, por lo que un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo con propiedades generalmente similares (tamaño, hidrofobicidad, etc), tal que el funcionamiento general es probable que no resulte afectado seriamente.

25 La subfamilia de la hormona de glicoproteína (GLH), una subfamilia de la superfamilia de los factores de crecimiento con nudo de cistina, comprende las hormonas: hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y gonadotropina coriónica (CG) y hormona foliculo estimulante (FSH). Todas las hormonas comprenden una subunidad alfa y una beta (GLHA y GLHB, respectivamente) y juegan un papel en la reproducción de los mamíferos. Por ejemplo FSH estimula las funciones testiculares y ováricas a través de la unión a un receptor acoplado a la proteína G ya sea las células de Sertoli (macho) o granulosa (hembra). Entre otras cosas, la LH estimula la ovulación y mantiene el cuerpo lúteo durante el ciclo menstrual, mientras que, por ejemplo, CG sostiene el cuerpo lúteo durante el embarazo. TSH es importante para la maduración de las células de Sertoli y función ovulatoria.

35 En un aspecto preferido, por lo tanto, se describe un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con la presencia de un miembro de la familia del factor de crecimiento con nudo de cistina de acuerdo con la invención, en donde dicho trastorno es un trastorno reproductivo. Además de tratar un trastorno reproductivo, una proteína, mímico y/o un anticuerpo o parte funcional o equivalente del mismo de acuerdo con la invención es especialmente útil también para prevenir la reproducción, es decir, prevenir el embarazo. Mediante la inhibición de una GLH, por ejemplo FSH, CG, LH o TSH, o la inhibición de la unión al receptor y/o señalización de dicho GLH en una hembra o un macho, la función ovulatoria o testicular se altera y se reducen las posibilidades de embarazo. La invención proporciona así un método para reducir la posibilidad de embarazo en un individuo hembra, que comprende administrar a dicha hembra o una pareja sexual de dicha hembra una cantidad eficaz de un mímico de proteína de acuerdo con la invención, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención, y/o un anticuerpo obtenible por un método de acuerdo con la invención o una parte funcional o equivalente funcional de dicho anticuerpo, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia de GLHA o GLHB.

50 Se describe además un mímico de proteína de acuerdo con la invención, una composición inmunogénica de acuerdo con la invención, y/o un anticuerpo obtenible por un método según la invención, o una parte funcional o equivalente funcional del mismo, para uso como un anticonceptivo para macho y/o hembra.

Se describe además un método para la unión y/o neutralización de un anticuerpo dirigido a un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un mímico de proteína como indicado en las reivindicaciones para un sujeto que comprende dicho anticuerpo. 55 Tras la unión del mímico de proteína a dicho anticuerpo, su actividad se ve disminuye. Los anticuerpos que son específicos a los miembros de la proteína con nudo de cistina se usan en los protocolos de tratamiento. Un ejemplo del mismo es Avastin™ específico para el VEGF, que se usa para tratar el cáncer metastásico. Anticuerpos, una vez administrados, tienen una vida media de varios días, incluso hasta varias semanas. Si, por ejemplo se dosifica un anticuerpo de este tipo o si no se desea más la acción del anticuerpo de este tipo, un mímico de proteína de la invención es especialmente útil para contrarrestar la acción de dicho anticuerpo mediante la unión y/o neutralización de dicho anticuerpo. 60 Un mímico de proteína de la invención es especialmente útil porque el mímico de proteína como tal no es o en menor medida es bioactivo y por lo tanto no interfiere con una afección para la que inicialmente se administró el anticuerpo. Por supuesto, es indeseable para el tratamiento de un paciente que recibe por ejemplo anticuerpos contra

VEGF con VEGF-bioactivo para neutralizar el anticuerpo. VEGF bioactivo administrado con exceso del anticuerpo presente puede ejercer su efecto biológico y puede debilitar el tratamiento con anticuerpo recibido hasta ese momento. Un ejemplo ilustrativo, que no limita la invención, es el uso de una imitan el mímico de proteína de VEGF, que se puede usar para unir y/o neutralizar un anticuerpo monoclonal contra VEGF, preferiblemente Avastin™. Avastin™ es un anticuerpo monoclonal disponible en el comercio contra VEGF, que se administra por ejemplo para tratar cánceres metastásicos. El tratamiento con Avastin™, sin embargo, puede conducir a disminuir o no completar la cicatrización de heridas (por ejemplo, cuando una incisión quirúrgica tiene problemas para cicatrizar o permanecer cerrada). En algunos casos, este evento resulta en fatalidad Por lo tanto no se recomienda iniciar la terapia con Avastin™ durante al menos 28 días después de la cirugía y hasta que la herida quirúrgica se cicatrice completamente. Por supuesto, durante la terapia con Avastin™, la cirugía debe ser evitada. Sin embargo, a veces es necesario realizar la cirugía en una persona que recibe la terapia con Avastin™. En tal caso, una VEGF truncada, preferentemente VEGF₂₆₋₁₀₄ es preferentemente administrada para neutralizar la circulación de anticuerpos anti-VEGF sin que se induzca más efecto biológico que simule la propia acción de VEGF. Poco después de la administración de la VEGF truncada y la neutralización de los anticuerpos anti-VEGF, el paciente puede someterse a una cirugía sin los efectos secundarios graves anteriormente mencionados que se observan normalmente después de la cirugía durante la terapia con Avastin™.

En un aspecto preferido, por lo tanto, se describe un método para la unión y/o neutralización de un anticuerpo dirigido a un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un mímico de proteína que comprende dicho anticuerpo de acuerdo con la invención a un sujeto, en el que donde dicho anticuerpo es Avastin™ y dicho mímico de proteína es VEGF₂₆₋₁₀₄.

Se proporciona además el uso de un mímico de proteína de acuerdo con la invención para la elaboración de un medicamento para la neutralización de un anticuerpo dirigido a un miembro la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina. En una modalidad preferida dicho anticuerpo es Avastin™ y dicho mímico de proteína es VEGF₂₆₋₁₀₄ como explicado anteriormente.

Otro miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, que pertenece a la subfamilia TGF-beta, es la esclerostina, el producto de proteína secretado del gen SOST, que es un inhibidor derivado de osteocitos de osteoblastos cultivados. La deficiencia de esclerostina conduce a la esclerosteosis y enfermedad van Buchem, dos trastornos esclerosantes raros, estrechamente relacionados que se caracterizan por el aumento sustancial de la masa ósea de buena calidad que se debe a la formación ósea aumentada. A diferencia, la osteoporosis, un trastorno en el que se reducen la densidad y calidad ósea, lo que conduce a la debilidad del esqueleto y riesgo aumentado de fracturas, particularmente de la columna vertebral, muñeca, cadera, pelvis y brazo superior, es causada posiblemente por un exceso de producción de la esclerostina, lo que inhibe la formación de hueso. Un mímico de proteína agonista o antagonista de la de esclerostina y/o un anticuerpo específico para esclerostina es por lo tanto especialmente útil para el tratamiento de un trastorno óseo. En un aspecto preferido, por lo tanto, se describe un método de acuerdo con la invención, en donde dicho trastorno comprende un trastorno asociado con la regulación ósea alterada. En un aspecto más preferido, dicho trastorno comprende la osteoporosis o esclerosteosis.

La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos que no limitan el alcance de la invención, sino que simplemente sirven para aclarar aspectos específicos de la invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Espectro de Masa de ionización por electrospray (ESI/MS) de humVEGF₂₅₋₁₀₇ (Boc) en A) forma completamente reducida ($MM_{calc} = 9569.1$; $MM_{exp} = 9566.4$), y B) después del plegamiento oxidativo ($MM_{calc} = 9563.1$; $MM_{exp} = 9560.7$). Condiciones del plegamiento como se describió anteriormente.

Figura 2. A) Inhibición de unión-Avastin™ a la humVEGF inmovilizada a la superficie₁₋₁₆₅ (1 µg/mL; acoplamiento-GDA) en el ELISA de concentraciones variables (125 µM a 2 pM) de oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ (■), humVEGF₁₋₁₆₅ (A), y un péptido ciclado de cadena principal que cubre sólo el bucle β5-giro-β6 de humVEGF (humVEGF₇₄₋₉₈) (X). B) Inhibición de la unión-Avastin™ a la humVEGF inmovilizada a la superficie₁₋₁₆₅ (1 µg/mL; acoplamiento-GDA). en el ELISA de concentraciones variables (5 µM a 12.8 pM) de humVEGF₁₋₁₆₅ (A), oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ sintetizado a través del procedimiento-1 (cuadrado gris), o oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ sintetizado a través del procedimiento-2 (cuadrado blanco).

Figura 3. Primeros datos de neutralización de ensayo de proliferación celular/BaF3 con suero inmune de rata anti-oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ sin purificar (I) 50.49 y 50.67 en la dilución 1/50 y 1/100. AcM Avastin™ (anti-humVEGF₁₋₁₆₅) se usó como control positivo, suero pre-immune (PI) (50.49 y 50.67) como control negativo. El nivel de proliferación observado en humVEGF_{1-1.65} = 0.6 ng/mL se estableció por defecto en 100%, niveles de proliferación de suero se expresaron como % del predeterminado. Sueros pre-inmunes se tomaron justo antes de la primera inmunización. Sueros inmunes se tomaron 6 semanas después de la primera inmunización. En gris: % de proliferación <50; en negro: % de proliferación entre 50 y 100.

Figura 4.

Datos de la neutralización a partir del ensayo de proliferación celular/BaF3 con suero de rata anti-oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ sin purificar A) 50.49 y B) 50.67 a partir de la dilución 1/50 y 1/3200. Para más detalles, ver la Figura 3.

Figura 5.

5 Datos de la neutralización a partir del ensayo de proliferación celular/BaF3 con suero de rata anti-oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ purificado con proteína G A) 50.49 y B) 50.67 a partir de la dilución 1/50 y 1/3200. Para más detalles, ver la Figura 3.

Figura 6.

10 Datos de la neutralización a partir del ensayo de proliferación celular/BaF3 con suero inmune de ratón anti-oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ sin purificar (I) 59.01-59.05 (04 muertos). AcM Avastin™ (anti-humVEGF₁₋₁₆₅) y suero de rata anti-oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ 50.67 se usaron como control positivo; suero pre-immune (PI) como control negativo. El nivel de proliferación observado en humVEGF₁₋₁₆₅=1.2 ng/mL se estableció por defecto en 100%, niveles de proliferación de suero se expresaron como % del predeterminado. PI: suero tomado justo antes de la primera inmunización; I: suero tomado 6 semanas después de la primera inmunización.

Figura 7.

15 Inhibición de la unión de Avastin™ a humVEGF inmovilizado a la superficie₁₋₁₆₅ con sueros inmunes de rata sin purificar 50.49 y 50.67 en la dilución 1/5 y 1/25. Suero de péptido 31.1 (inducido contra el péptido **CLIPS**/SS-doble-forzado derivado a partir de la secuencia del bucle-83 de **FSH**₅₆₋₇₉ hum de la Hormona folículo estimulante; suero que tiene una alta actividad neutralizante para FSH en el ensayo basado en células) y suero 45.09 (inducido contra el péptido cíclico de la cadena principal derivado de la secuencia 70 a 102 del bucle β5-giro- β6 de VEGF; suero que tiene actividad neutralizante para humVEGF₁₋₁₆₅ en el ensayo de proliferación celular-BaF3) se usaron como controles negativos. Concentración mínima de Avastin™ (~10 ng/mL) se usó (DO_{450nm}~0.4) para asegurar la máxima sensibilidad de los experimentos de inhibición.

Figura 8.

25 Datos de proliferación a partir del ensayo celular/BaF3 con **VEGF**hum₂₆₋₁₀₄ a diferentes concentraciones (0.01-20 ng/mL), ya sea en ausencia o presencia de hum**VEGF**₁₋₁₆₅. El nivel de proliferación observado hum**VEGF**₁₋₁₆₅=1.2 ng/mL se estableció por defecto en 100%, niveles de proliferación de suero se expresaron como % del predeterminado.

Figura 9.

Visión esquemática general del ensayo de proliferación.

Figura 10.

30 Nombre completo de la proteína, especie a partir de la cual se aisló la proteína, y secuencia de aminoácidos para todas las proteínas conocidas que son parte de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, subdividida en subfamilias TGF-beta, GLH-beta, NGF, PDGF, GLHA, tipo Noggin, tipo coagulina, y tipo CTCK. Secuencias consenso definidas por subfamilia se proyectan en la parte superior de la lista de secuencias para cada miembro.

Figura 11.

35 Representación esquemática de la estructura general de los distintos miembros de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina.

Figura 12.

40 A) Aumento del volumen tumoral promedio (mm³) por ratones en el grupo de tratamiento 1:PBS (●), 2:anti-oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ (Δ), y 3:AVASTIN™ (V). En el grupo de PBS 4/9 ratones se sacrificaron (#) antes del día previsto, ya que el volumen estimado de los tumores superó el volumen máximo (pre-establecido). B) Peso tumoral promedio total (mgs) por ratones en cada grupo de tratamiento diferente al final del experimento. C) Volumen total del tumor (mm³) de ratones individuales en cada grupo de tratamiento diferente al final del experimento (ratón 3 en grupo-PBS murió antes del inicio del experimento).

Figura 13

45 red-ratVEGF₂₆₋₁₀₄ (A/B) y oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄ (C/D).

Figura 14.

Gráficos de la unión en el ELISA del suero de rata anti-oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ 1+2 (líneas negras ----- y - - -) y suero de rata anti-oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄ 3+4 (líneas grises ----- y - - -) tanto en A) oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄ como B) oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄.

Figura 15.

50 HPLCs (A/C) y espectros de masas de ionización por electrospray (B/D) de red-humPLGF₃₄₋₁₁₂ (A/B) y oxid-humPLGF₃₄₋₁₁₂ (C/D).

Figura 16.

Tres fragmentos de condensación de humSOST₅₇₋₁₄₄ a partir del fragmento humSOST-F1, humSOST-F2, y humSOST-F3 mediante ligación química nativa. Etapa A: ligación de humSOST-F2 tiaprolina protegida con humSOST-F3, generando SOST-F2/3 protegido. Etapa B: Desprotección del humSOST-F2/3 con metoxiamina a pH 4.0. Etapa C: ligación de humSOST-F2/3 desprotegido con humSOST-F1 generando humSOST₅₇₋₁₄₄ a pH 6.5.

Figura 17.

60 Renaturalización oxidativa de red-humSOST₅₇₋₁₄₄ después de la cromatografía de intercambio iónico. El péptido se pliega con arginina 0.4 M, glutatión (rojo) 1.67mM, glutatión (ox) 0.33 mM, Tris-HCl 55 mM, cloruro sódico 21 mM, cloruro potásico 0.88 mM, pH 8.0, rindiendo 10.2% del producto deseado después de 3.5 días a 4 °C.

Figura 18.

HPLCs (A/C/E) y espectros de masas de ionización por electrospray (B/D/F) del red-humSOST completo₅₇₋₁₄₄ (A/B), oxid-humSOST oxidativamente plegado₅₇₋₁₄₄ (C/D), humSOST octa-acetamido derivatizado₅₇₋₁₄₄(E/F).

Figura 19.

Datos en el ELISA de la unión de los anticuerpos biotinilados seleccionados de oxid-humSOST₅₇₋₁₄₄ a partir de la genoteca-PDL. La unión positiva en 1. humSOST recombinante, 2. oxid-humSOST biotinilado ₅₇₋₁₄₄ en sí, y la ausencia de unión en 3. AAs-SOST₅₇₋₁₄₄, 4. GST, 5) CD33, y finalmente 6. Albúmina sérica bovina (BSA) ilustra la alta especificidad de la unión del anticuerpo.

Figura 20.

HPLCs (A/C) y espectros de masa de ionización por electrospray (B/D) de red-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇ (A/B) y oxid-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇ (C/D).

Figura 21.

(A) Títulos de anticuerpos en ELISA para sueros de rata 9wpv (1 y 2 + sueros pre-inmunes) que se indujeron mediante inmunización con oxid-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇. Los títulos se definieron como el -10log[concn] en el que la DO en el ELISA es igual a 4x la señal de fondo. (B) Unión del anticuerpo en el ELISA de los sueros de rata 9wpv a 1) humTGFB2trunc-1 (con VEGF **bucle-b2**), 2) humTGFB2trunc-2 (con la secuencia PGGSPA reemplazando la humTGF-B2 nativa **bucle-b2**), y 3) humVEGFtrunc inmovilizados en la superficie.

humTGFB2trunc 1: acetil-C1ALRPLYIDFKRDLGWKWIHEP
 KGYNANFC2AGAC3NDEGLEC4VSQDLEPLTILYYIGKTPKI EQLSNMIVKSC5KC6-amida
 humTGFB2trunc 2: acetil-C1ALRPLYIDFKRDLGWKWIHEP
 KGYNANFC2AGAC3PGGSPAC4VSQDLEPLTILYYIGKTPKI EQLSNMIVKSC5KC6-amida
 VEGFtrunc: acetil-C1HPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSAVPL
 MRC2GGAC3NDEGLEC4VPTEESNITMQIMRIKPHQGGHIG EMSFLQHNC5EC6-amida

EJEMPLOS

EJEMPLO 1A: Síntesis de varias formas de VEGF-truncado.

Se sintetizaron tres formas diferentes de VEGF-truncado:

humVEGF₂₆₋₁₀₄:

²⁶Ac-C1HPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSAVPLMRC1GGAC3NDEGLEC
 4VPTEESNITMQIMRIKPHQGGHIGEMSFLQHNC5EC6#₁₀₄

humVEGF₂₅₋₁₀₇:

²⁵Ac-YC1HPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSAVPLMRC2GGAC3NDEGLE
 C4VPTEESNITMQIMRIKPHQGGHIGEMSFLQHNC5EC6RPK#₁₀₇

humVEGF₂₅₋₁₀₉:

²⁵Ac-YC1HPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSAVPLMRC2GGSC3NDEGLE
 C4VPTEESNITMQIMRIKPHQGGHIGEMSFLQHNC5EC6RPK#₁₀₉

Los aminoácidos se indican mediante los códigos de una sola letra; "Ac" se refiere a la acetilación N-terminal; "#" indica amidación C-terminal; cisteínas (C1-C6) en **negrita** indican cisteínas implicadas en la formación del pliegue con nudo de cistina; alaninas en **negrita** indican cisteínas nativas que se reemplazaron por Ala.

Se usaron tres procedimientos sintéticos diferentes:

I. Síntesis directa (Fmoc) del péptido de longitud-completa; sólo se usa para humVEGF₂₆₋₁₀₄.

II. Síntesis del tioéster-péptido usando química-Fmoc. Después de la ligación química nativa (NCL) de fragmentos de péptidos humVEGF₂₆₋₆₇ (tioéster) + humVEGF₆₈₋₁₀₄ (cisteína N-terminal libre) para humVEGF₂₆₋₁₀₄, humVEGF₂₅₋₆₇ (tioéster) + humVEGF₆₈₋₁₀₇ (cisteína N-terminal libre) para humVEGF₂₅₋₁₀₇, y humVEGF₂₅₋₆₇ (tioéster) + humVEGF₆₈₋₁₀₉ (cisteína N-terminal libre) para humVEGF₂₅₋₁₀₉.

III. Síntesis del tioéster-péptido usando química-Boc. Después de la ligación química nativa (NCL) de fragmentos de péptidos humVEGF₂₅₋₆₇ (tioéster) + humVEGF₆₈₋₁₀₇ (cisteína N-terminal libre) para humVEGF₂₅₋₁₀₇ y humVEGF₂₆₋₆₇ (tioéster) + humVEGF₆₈₋₁₀₄ (cisteína N-terminal libre) o VEGF₂₆₋₆₀ (tioéster) + humVEGF₆₁₋₁₀₄ (cisteína N-terminal libre) para humVEGF₂₆₋₁₀₄.

Procedimiento I:

Procedimiento general (A) para la síntesis Fmoc del péptido:

Los péptidos se sintetizaron en fase sólida usando una resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi (RinkAmide) (BACHEM, Alemania) en un sintetizador Symphony (Protein Technologies Inc., Estados Unidos), Voyager (CEM GmbH, Alemania), o Syroll (MultiSyntech, Alemania). Todos los aminoácidos-Fmoc se adquirieron de Biosolve

(Países Bajos) o Bachem GmbH (Alemania) con funcionalidades de la cadena lateral protegidas como grupos N-*t*-Boc (KW), O-*t*-Bu (DESTY), N-Trt (HNQ), S-Trt (C), o N-Pbf (R). Un protocolo de acoplamiento usando un exceso de 5 veces de HBTU/HOBt/amino ácido/DIPEA (1:1:1:2) en NMP con un tiempo de activación de 20 minutos usando acoplamientos dobles se empleó para cada etapa de acoplamiento de aminoácidos. La acetilación (Ac) del péptido se realizó mediante la reacción de la resina con NMP/Ac₂O/DIEA (10:1:0.1, v/v/v) durante 30 min a temperatura ambiente. El péptido acetilado se escindió de la resina mediante la reacción con TFA (40 mL de resina/mmol) que contiene fenol al 13.3% (p), tioanisol al 5% (v), 1,2-etanoditiol al 2.5% (v) de , y H₂O-milliQ al 5% (v) durante 2 horas a temperatura ambiente, a menos que se indique de cualquier otra forma. La precipitación con Et₂O helado + liofilización del material precipitado proporcionó el péptido crudo.

humVEGF₂₆₋₁₀₄ se sintetizó en una etapa después de este procedimiento (carga-resina de 0.88 mmol/g) en un sintetizador Symphony (Protein Technologies Inc., Estados Unidos). En la primera etapa de acoplamiento se usó una mezcla de 4:1 (p/p) de Ac-cys(Trt)-OH y Fmoc-cys(Trt)-OH. El péptido acilado se escindió a partir de la resina mediante la reacción con una mezcla ligeramente diferente: TFA (resina de 40 mL/mmol) que contiene TES al 5% (v), 1,2-etanoditiol al 2.5% (v) , y H₂O-milliQ al 2.5% (v). Finalmente, el péptido se purificó por HPLC y se plegó por oxidación siguiente el procedimiento G.

Los fragmentos de péptidos humVEGF₆₈₋₁₀₄, humVEGF₆₈₋₁₀₇, y humVEGF₆₈₋₁₀₉ (cisteína N-terminal libre para NCL; ver procedimiento II) se sintetizaron siguiendo ese procedimiento como se describió anteriormente para humVEGF₂₆₋₁₀₄ en una resina Rink-Made (carga 0.5 mmol/g) usando un sintetizador Liberty (CEM GmbH, Alemania).

Procedimiento II:

Síntesis de péptidos tioésteres-Fmoc:

Los fragmentos de péptidos humVEGF₂₅₋₆₇ y humVEGF₂₆₋₆₇ (C-terminal libre) se sintetizaron en una resina SASRIN (carga 0.5 mmol/g; Bachem GmbH, Alemania) siguiendo el procedimiento general para la síntesis de péptidos-Fmoc como se describe en el procedimiento I. Los péptidos se escindieron de la resina mediante tratamiento repetido (20 ciclos) con TFA al 1% (40 mL/mmol de resina) en DCM. Las fracciones combinadas se neutralizaron con piridina, después DCM se eliminó por evaporación bajo presión reducida. Finalmente, los péptidos se precipitaron por adición de un exceso de H₂O, seguido por centrifugación y liofilización. Los péptidos crudos liofilizados se disolvieron en DCM (2.0 mM), 12 equivalentes de 4-acetamidotiofenol en DCM (0.334 mg/mL, 2.0 mM), se añadieron posteriormente 3 equivalentes de PyBOP en DCM (1.040 mg/mL, 2.0 mM), y 2.6 equivalentes de DIPEA en DCM (1 %vol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Después, se añadieron otros 12 equivalentes de 4-acetamidotiofenol en DCM (0.334 mg/mL, 2.0 mM) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se neutralizó con ~2.6 de TFA y DCM se eliminó por evaporación bajo presión reducida. Los tioésteres de fragmentos de péptidos crudos se desprotegeron después y se purificaron por RP-HPLC siguiendo los procedimientos generales.

Ligación química nativa (NCL) de fragmentos de péptidos:

La condensación de los fragmentos de péptidos humVEGF₆₈₋₁₀₄, humVEGF₆₈₋₁₀₇, o humVEGF₆₈₋₁₀₉(**A**) ya sea con tioésteres de fragmentos de péptidos de humVEGF₂₅₋₆₇ o humVEGF₂₆₋₆₇(**B**) mediante la ligación química nativa se realizó mezclando soluciones casi equimolares (1:1.2) de **A**(10 mg/mL; ~2.0 mM) y **B** (10 mg/mL; ~2.0 mM) en tampón de trabajo (6M de guanHCl/20mM TCEP/200mM MPAA en 0.2M de tampón fosfato pH 8.0;) y agitando toda la noche a temperatura ambiente. Después de la mezcla de las soluciones (ácidas!) el pH se ajustó a 6.5 mediante la adición de NaOH 10M (μL de NaOH es aproximadamente igual a mg de MPAA usado). El exceso de MPAA se eliminó por filtración Amicon usando de tampón de trabajo (sin MPAA !!) en las etapas de lavado. Finalmente, el humVEGF₂₆₋₁₀₄crudo, humVEGF₂₅₋₁₀₇, o humVEGF₂₅₋₁₀₉ en forma reducida se purificaron mediante RP/HPLC siguiendo el procedimiento estándar.

Plegado oxidativo de red-humVEGF₂₆₋₁₀₄, red-humVEGF₂₅₋₁₀₇, y red-humVEGF₂₅₋₁₀₉:

red-humVEGF₂₆₋₁₀₄red-humVEGF₂₅₋₁₀₇, o red-humVEGF₂₅₋₁₀₉ completamente reducidos se disolvieron en 0.1M de tampón Tris (pH 8.0), con o sin 1M de guanidina.HCl, que contiene 1.0 mM de cistina (forma-SS) y 8.0 mM cisteína (forma-SH) en una concentración final de 0.1 mg/mL y agitaron a temperatura ambiente. Inmediatamente, un pico intenso aparece en un tiempo de retención inferior (más polar), adicionalmente de algunos picos anchos que corresponden al péptido incompleto o incorrectamente plegado. Mientras que el análisis por HPLC no mostró cambios adicionales en las intensidades de picos (por lo general después de ~4 horas), la mezcla se cargó en una columna RP/C preparativa₁₈ y purificó siguiendo nuestro procedimiento estándar (ver más abajo).

Procedimiento III:

Procedimiento general para síntesis-*t*Boc de péptidos:

Fragmento de péptidos se prepararon mediante síntesis manual de péptido en fase sólida (SPPS) típicamente en una escala de 0.25 mmol usando el procedimiento in situ de neutralización/activación HBTU para la química Boc como se describió anteriormente. Cada ciclo sintético consistió en la eliminación de N α -Boc mediante un tratamiento de 1-2 min tratamiento con TFA puro, un lavado de 1 min con flujo de DMF, un tiempo de acoplamiento de 10 a 20 min con 1.0 mmol de aminoácido Boc preactivado en presencia de un exceso de DIEA, seguido de un segundo lavado con flujo de DMF. Aminoácidos N α -Boc (1.1 mmol) se preactivaron durante 3 min con 1.0 mmol de HBTU (0.5 M en DMF) en presencia de un exceso de DIEA (3 mmol). Después del acoplamiento de los residuos de Gln, se usó un lavado de flujo de DCM antes y después de la desprotección usando TFA, para evitar posible formación de ácido pirrolidincarboxílico catalizado por (TFA/DMF) en alta temperatura. Los aminoácidos de la cadena lateral protegida fueron: Boc-Arg (p-toluenosulfonil)-OH, Boc-Asn(xantil)-OH, Boc-Asp(O-ciclohexil)-OH, Boc-Cys(4-metilbenzil)-OH, Boc-Glu(O-ciclohexil)-OH, Boc-His(dinitrofenil)-OH, Boc-Lys(2-CI-Z)-OH, Boc-Ser(bencil)-OH, Boc-Thr(bencil)-OH, y Boc-Tyr(2-Br-Z)-OH. Se usaron otros aminoácidos sin la protección de la cadena lateral. La N α -acetilación de los péptidos se realizó mediante tratamiento con anhídrido acético (0.1 M)/piridina (0.1 M) en DMF durante 2 x 2 min). Después de que se completó el ensamblaje de la cadena, los péptidos se desprotegeron y escindieron de la resina mediante el tratamiento con HF anhidro durante 1 hora a 0°C con p-cresol al 4% como depurador. En todos los casos, los grupos protectores dinitrofenilo (Dnp)- cadena lateral imidazol permanecieron con sus residuos His debido a que el procedimiento de eliminación de Dnp es incompatible con grupos tioésteres de C-terminal. Sin embargo, el Dnp se elimina gradualmente por los tioles durante la reacción de ligación rindiendo His sin protección. Después de la escisión, los fragmentos de péptidos se precipitaron con éter dietílico helado, disolvieron en acetonitrilo acuoso y liofilizaron.

Preparación de la resina (-COSR) generadora de tioéster:

1.1 mmol de N α -Boc Leu se activó con 1 mmol de HBTU en presencia de 3 mmol de DIEA y acopló durante 10 min con 0.25 mmol de la resina MBHA. A continuación, 1.1 mmol del ácido S-tritil mercaptopropiónico se activó con 1 mmol de HBTU en presencia de 3 mmol de DIEA y acopló durante 30 min con la resina Leu-MBHA. La resina resultante leucina-ácido tritil mercaptopropiónico se puede usar como una resina de partida para el ensamblaje de la cadena polipeptídica después de la eliminación del grupo protector tritilo con 2 tratamientos x 1 min con triisopropilsilano al 2.5% y H₂O en TFA al 2.5%. El enlace tioéster se formó con el aminoácido deseado usando protocolos estándares de acoplamiento de péptidos. El tratamiento del péptido final con HF anhidro rindió los péptidos tioésteres (-COSR) activados en C-terminal con ácido mercaptopropiónico-leucina (MPAL) para la participación en la reacción de ligación química nativa.

Ligación química nativa (NCL) de fragmentos de péptidos:

La ligación de los tioésteres del fragmento de péptido totalmente desprotegido humVEGF₂₆₋₆₀, humVEGF₂₆₋₆₇, y humVEGF₂₅₋₆₇ ya sea con los fragmentos de péptidos humVEGF₆₁₋₁₀₄, humVEGF₆₈₋₁₀₄, o humVEGF₆₈₋₁₀₇ se realizó como sigue: fragmentos de péptidos se disolvieron en una relación molar ~1:1 a 10 mg/ml en 0.1 M de tampón tris, pH 8.0, que contiene 6 M de guanidina. Se añadieron bencilmercaptano y tiofenol a 2% (v/v) resultando en una concentración de péptido final de 1-3 mM en un pH ~ 7 (disminuido debido a la adición de tioles y TFA del péptido liofilizado). La reacción de ligación se realizó en un bloque térmico a 37° y se agitó en vórtex periódicamente para equilibrar los aditivos de tiol. La reacción se controló por HPLC y ESI-MS hasta su completamiento. NCLs respectivos (humVEGF₂₆₋₆₀ + humVEGF₆₁₋₁₀₄; humVEGF₂₆₋₆₇ + humVEGF₆₈₋₁₀₄) rindió VEGF₂₆₋₁₀₄ reducido con especificaciones idénticas de HPLC y ESI-MS. Plegado oxidativo de red-humVEGF₂₆₋₁₀₄ y red-humVEGF₂₅₋₁₀₇: red-humVEGF₂₆₋₁₀₄ y red-humVEGF₂₅₋₁₀₇ completamente reducidos se disolvieron en 0.1 M de tampón Tris (pH 8.0), con o sin 1M de guanidina. HCl, que contiene 1.0 mM de cistina (forma-SS) y 8.0 mM de cisteína (forma-SH) en una concentración final de 0.1 mg/ml y agitaron a temperatura ambiente. Inmediatamente, un pico intenso aparece en un tiempo de retención inferior (más polar) correspondiente a la estructura nudo-cys correctamente plegada, adicionalmente de algunos picos anchos que corresponden con el péptido incompleto o incorrectamente plegado.

Mientras que el análisis por HPLC no mostró cambios adicionales en las intensidades de picos (por lo general después de ~4 horas), la mezcla se cargó en una columna RP/C preparativa₁₈ y purificó siguiendo nuestro procedimiento estándar (ver más abajo).

Procedimiento general para la purificación mediante HPLC:

Los péptidos crudos se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), ya sea en una columna preparativa C₁₈ RP-18 "Deltapack" (25x100 o 40x210 mm diámetro interior, 15 μ m de tamaño de partícula, 100 Å de tamaño de poro; Waters, Estados Unidos) o en una "Atlantis" (10x100 mm diámetro interior, 5 μ m tamaño de partícula (Waters, Estados Unidos) con un gradiente lineal AB de 1-2% de B/min. donde el solvente A fue TFA al 0.05% en agua y el solvente B fue TFA al 0.05% en ACN. Alternativamente, HPLC analítico de fase reversa se realizó en un sistema Varian Prostar usando columnas C-18 Vydacu (5 μ m, 0.46 x 15 cm) y HPLC fase reversa preparativa se realizó en un sistema Waters usando columnas C-18 Vydac (10 μ m, 1.0/2.5 x 25 cm). Gradientes lineales de acetonitrilo en

agua/TFA al 0.1% se usaron para eluir los péptidos unidos. Las velocidades de flujo usadas fueron 1 ml/min (analítica), y 5/10 ml/min (preparativa).

Análisis por RP-HPLC/ESI-MS:

El análisis del péptido purificado se realizó por cromatografía en líquido de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) en un "Acquity UPLC (Waters, Estados Unidos) usando una columna "BEH " preparativa RP-18 (2.1x50 diámetro interior, 1.7 mm tamaño de partícula, Waters, Estados Unidos) con un gradiente lineal AB (5-55% de B, 25% de B/min), donde el disolvente A fue TFA al 0.05% en agua y el disolvente B fue TFA al 0.05% en ACN. El peso molecular del ion primario de los péptidos se determinó por espectrometría de masas de ionización por electrospray.

Análisis por ESI-MS:

La espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS) de las muestras de HPLC se realizó en un espectrómetro de masas cuádruplo simple API-150 (Applied Biosystems). Las masas de péptidos se calcularon a partir de la masa experimental para la relaciones de carga (m/z) de todos los estados de protonación observados de un péptido usando el programa de análisis.

Para cada péptido se determinaron las siguientes características:

Péptido	Estado oxidación(RED/OX)	de	Retención (%ACN)	MM calculada	MM experimental
Red-humVEGF ₂₆₋₁₀₄	RED		48.5	9065.6	9064.4
oxid-humVEGF ₆₋₁₀₄	OX		42.5	9059.6	9058.5
Red-humVEGF _{25-107(Boc)}	RED		45.8	9569.1	9566.4
oxid-humVEGF _{25-107(Boc)}	OX		40.5	9563.1	9560.7
Red-humVEGF _{25-107(Fmoc)}	RED		45.8	9569.1	9568.8
oxid-humVEGF _{25-107(Fmoc)}	OX		40.5	9563.1	9561.7
Red-humVEGF ₂₅₋₁₀₉	RED		43.8	9869.5	9869.6
oxid-humVEGF ₂₅₋₁₀₉	OX		38.2	9863.5	9863.8

Estos datos y la Figura 1 muestran que las varias formas de humVEGF_{trunc} puede sintetizarse de varias maneras diferentes, con resultados idénticos.

EJEMPLO 1B: Actividad inhibidora de oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ en Avastin™ que se une a oxid-humVEGF₁₋₁₆₅ inmovilizado a la superficie.

ELISA de unión: La unión de varios AcMs (Avastin™, mAb 293, PDL-anticuerpo) a oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ y humVEGF₁₋₁₆₅ se determinó en el ELISA. Por lo tanto, placas de poliestireno placas de 96 pocillos (Greiner, Alemania) se trataron con 100µL/pocillo de dialdehído glutárico al 0.2% en tampón fosfato (0.1 M, pH = 5) durante 4 horas a temperatura ambiente mientras se agita, seguido con lavado (3x10min) con tampón fosfato (0.1 M, pH=8). Después, los pocillos se recubrieron con 100 µL/pocillo de una solución de 1 µg/mL de oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄/humVEGF₁₋₁₆₅ en tampón fosfato (0.1 M, pH=8) durante 3 horas a 37 °C, seguido por reposo durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar con Tween80 al 1% (3x), las placas se incubaron con el anticuerpo a diversas diluciones diferentes en suero de caballo (4% en PBS/Tween 80 al 1%/NaCl al 3%), comenzando con una dilución 1/10 en el primer pocillo y etapas de dilución de 3 veces en los pocillos posteriores. La incubación se realizó durante 1 hora a 37 °C, seguido por el lavado con Tween-80 al 1% (3x). Después, las placas se incubaron con 100 µL/pocillo de suero de cabra-anti-rata marcada con peroxidasa (dilución 1/1000 en suero de caballo al 4%, ver anteriormente) durante 1 hora a 25 °C, seguido por el lavado con Tween80 al 1% (4x). Por último, las placas se incubaron con una solución de 0.5 µL/mL de ABTS (2,2'-azina-

di(sulfonato etilbenzotiazolina)) que contiene H₂O₂ al 0.006% en ácido cítrico/tampón fosfato (0.1 M cada , pH=4). Valores de DO_{405nm} se midieron después de 45 min. de reposo a temperatura ambiente en lo oscuro.

ELISA de competición: Se llevaron a cabo estudios de competición de ELISA de unión siguiendo en gran medida el procedimiento como se describe para el ELISA de unión (ver anteriormente). La incubación con el anticuerpo se llevó a cabo a una concentración de anticuerpo fija (10 ng/mL de Avastin™; DO_{405nm} entre 1.0-1.5) de cantidades decrecientes de **oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄**(inicio en 5 μM; etapas de dilución 1/5) y **humVEGF₁₋₁₆₅** (control positivo; inicio en 500 nM; etapas de dilución 1/5).

Los datos en la Figura 2 muestran que oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ se une con diferencia en la afinidad menor que 5 veces (en comparación con humVEGF₁₋₁₆₅) a Avastin™, mientras que el mimico del péptido (cíclico)derivado del bucle beta3 de humVEGF es >10 000-veces menos activo en la unión con Avastin™. Esto ilustra un gran paso adelante en la reconstrucción del sitio de unión discontinuo del Avastin™ en humVEGF usando la nueva tecnología de la presente invención.

EJEMPLO 1C: Uso de oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ para generar anticuerpos neutralizantes-VEGF y sueros en ratas y ratones.

Experimentos de inmunización usando **oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄** (sin conjugar a una proteína portador!!) se llevaron a cabo tanto en ratas Wistar hembras como en ratones Balb/C hembras. Los antiseros se analizaron para:

- A) unión a humVEGF₁₋₁₆₅ inmovilizado a la superficie (determinación del título)
- B) capacidad de inhibir la unión del Avastin™ a la humVEGF₁₋₁₆₅ inmovilizado a la superficie
- C) actividad de neutralización para humVEGF₁₋₁₆₅ en un ensayo de proliferación celular-BaF3

Los resultados de estos estudios se muestran más abajo y en las Figuras 3-6.

Protocolos de inmunización:

Ratas Wistar: Ratas Wistar hembras se inmunizaron con **anti-humVEGF₂₆₋₁₀₄** en el día 0 con 400 μL (intramuscular + subcutáneo, 200 μL cada) de una solución de 375 μg/mL de **humVEGF₂₆₋₁₀₄** en PBS/CoVaccine 1:1 (v/v) (PBS = solución salina regulada con fosfato), seguido por un refuerzo (igual cantidad y concentración) en las semanas 2 y 4. Posteriormente, las ratas se sangraron después de 6 semanas y se recogieron los antiseros. Los títulos de anti-VEGF se determinaron como se describe más abajo.

Ratones Balb/C: La inmunización con **humVEGF-oxid₂₆₋₁₀₄** se realizó en ratones Balb/C hembras, con 2 formulaciones diferentes, es decir, una con adyuvante CFA /IFA (grupo 1: 2 animales), y con un adyuvante CoVaccine (grupo 2: 3 animales). Los animales (2) en el grupo 1 se inmunizaron por vía intraperitoneal (i.p.) en el día 0 con 250 μL de una solución de 1.0 mg/mL de **oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄** en PBS/CFA 2:3 (v/v) (PBS = solución salina regulada con fosfato, CFA = Adyuvante Completo de Freund), seguido de un refuerzo (igual cantidad, método y concentración; Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) en lugar de CFA) a las 4 semanas. Los animales (3) en el grupo 2 se inmunizaron en el día 0 con 210 μL (intramuscular + subcutáneo, 105 μL cada) de una solución de 1.25 mg/mL de VEGF₂₆₋₁₀₄ en PBS/CoVaccine 1:1 (v/v) (PBS = solución salina regulada con fosfato), seguido por un refuerzo (igual cantidad, método y concentración) en las semanas 2 y 4. Posteriormente, las 5 ratas se sangraron después de 6 semanas y se recogieron los antiseros. Los títulos de anti-VEGF se determinaron como se describe más abajo.

Determinación del título por ELISA:

Los títulos se calculan determinando la dilución de suero para los que DO_{405nm} es igual a 4xDO_{405nm} la que de una solución tampón (ver "Estudios del ELISA de unión, Ejemplo 1B"). El título define el valor ¹⁰negativo del factor de dilución (1/10=1, 1/100=2, 1/1000=3, 1/10000=4, etc.).

Animal	humVEGF ⁻¹⁻¹⁶⁵ título 0 wpv	humVEGF ¹⁻¹⁶⁵ título 6 wpv
50.49 (rata Wistar 1; CoVaccine)	<<2	4.8
50.67 (rata Wistar 2; CoVaccine)	<<2	5.4
59.01 (ratón Balb/C 1, CFA/IFA)	<<2	5.3
59.02 (ratón Balb/C 2, CFA/IFA)	<<2	5.2
59.03 (ratón Balb/C 3, CoVaccine)	<<2	5.4
59.04 (ratón Balb/C 4, CoVaccine)	<<2	†
59.05 (ratón Balb/C 5, CoVaccine)	<<2	5.3
Abs Control		
Avastin™ (500 ng/mL inicio)	-	4.4
BioVision™ (5000 ng/mL)	-	4.2

20 Estudios de ELISA de competición de antisuero de rata con Avastin™:

Se llevaron a cabo estudios de competición de ELISA de unión siguiendo en gran medida el procedimiento como se describe para el ELISA de unión (ver anteriormente). La incubación con el anticuerpo se llevó a cabo a una concentración de Avastin™ fija (10 ng/mL; DO_{405nm} entre 1.0-1.5) en presencia de cantidades decrecientes de antisueros de rata (inicio en 1/5; etapas adicionales de dilución 1/3).

Neutralización de ensayo de proliferación de células BaF3:

30 Las células que se usan en el ensayo son los linfocitos pre-B murinos estables que expresan el receptor de humVEGF 2 humano (h) (Makinen y otros, 2001). Estas células recombinantes sobreviven/prolifera solamente en presencia de IL-3 (citoquinas naturales requeridas para la supervivencia de las células parentales) o humVEGF. Para el experimento de IL-3 tiene que lavarse el medio para que se pueda probar la capacidad de proliferación en la dependencia de humVEGF.

35 Las células Ba/F3 R2 se crecieron en DMEM (Gibco #31885) que contiene suero fetal bovino al 10 % (Perbio #CH30160.03), 2 mM L-glutamina (Sigma #G7513), 2 ng/ml mL-3 (Calbiochem #407631) y 500 µg/ml Zeocina (Invitrogen #450430). Las células se crecieron a 37°C en una incubadora humidificada con una atmósfera de 5% CO₂/95% de aire.

40 humVEGF diferencialmente concentrado (+ humVEGF) o medio (-humVEGF) se añadió ya sea directamente a las células (para probar la eficiencia de proliferación) o pre-incubado durante 1 hora con diferentes concentraciones de Avastin™ (control positivo), diferentes concentraciones de sueros de rata o ratón y después se añadió a las células (en caso de experimentos de inhibición). Dos días más tarde la proliferación celular se midió añadiendo WST-1 (Roche #1644807). Ver Figura 9 para una representación gráfica del ensayo.

45 El ensayo de WST-1 se basa en la medición de la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial. Para funcionar correctamente esta enzima requiere la integridad de este organelo y es un buen indicador del número de células que proliferan presentes en el cultivo. Una sal de tetrazolio (WST-1) se usa como sustrato ya que genera un metabolito oscuro soluble (formazan) a través de la acción de la enzima, que después se cuantificó midiendo la absorbancia (450 nm) en un lector de ELISA. Mayor es la absorbancia medida en el ensayo, más fuerte es la proliferación. La absorbancia se correlaciona positivamente con la proliferación. Los experimentos se repitieron tres veces, por triplicado, mostrando resultados similares.

55 *Los datos obtenidos demuestran que los altos niveles de anticuerpos se generaron con éxito a través de la inmunización con oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ (no conjugado a una proteína portador!!) , tanto en ratas Wistar hembras como en ratones Balb/C hembras. Los antisueros generados de esta manera presentan una fuerte actividad neutralizante para humVEGF₁₋₁₆₅ en un ensayo de proliferación de células BaF3 (Figura 3-6), y la capacidad de inhibir la unión de Avastin™ con humVEGF (Figura 7).*

60 **EJEMPLO 1D:** oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ no induce la proliferación de células BaF3 por sí misma.

Para comprobar si oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄, la forma truncada de humVEGF₁₋₁₆₅, es capaz de inducir además la proliferación celular-BaF3, se mide la proliferación celular en presencia de cantidades variables de oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ (0.01-20 ng/mL). Para comprobar si oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ era capaz de mejorar o inhibir la capacidad proliferativa de humVEGF₁₋

¹⁶⁵, en sí, los experimentos con cantidades variables de oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ se corrieron además en presencia de humVEGF₁₋₁₆₅=1.2 ng/mL.

Los resultados mostrados en la Figura 8 demuestran claramente ninguna actividad para oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ en la proliferación celular-BaF3 ni efecto sobre la capacidad de proliferación de humVEGF₁₋₁₆₅.

EJEMPLO 1E: Estudio de la inmunización pasiva con anticuerpos de rata anti-humVEGF₂₆₋₁₀₄ en ratones Swiss nu/nu inoculados con células tumorales LS174T humanas: prueba del principio in vivo del potencial reductor del tumor de los antisueros anti-humVEGF₂₆₋₁₀₄.

Para demostrar el potencial reductor del tumor del antisuero anti-humVEGF₂₆₋₁₀₄, el siguiente experimento de inmunización se llevó a cabo en 30 ratones Swiss nu/nu machos (Charles river), 6 semanas de edad al comienzo del estudio. Los animales se dividieron en los 3 grupos de tratamiento siguientes:

Grupo 1: PBS (n=10; grupo control negativo): intraperitoneal (i.p.) Inyecciones con PBS (500 µl) después de la inoculación de la célula tumoral.

Grupo 2: oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ (n=10): inyecciones i.p. (500 µl) con IgG-purificada antisuero de rata anti-péptido VEGF después de la inoculación de la célula tumoral.

Grupo 3: AVASTIN™ (n=10; grupo control positivo): inyecciones i.p. (500 µl) con AcM AVASTIN™ anti-humVEGF después de la inoculación de la célula tumoral.

El día 1 del estudio, los 30 ratones se inyectaron por vía subcutánea (flanco derecho) con 10 millones de células tumorales humanas LS174T suspendidas en una solución de 100 µL. La toma del tumor fue ~100%. Posteriormente, los ratones recibieron inyecciones i.p. (500 µl) en el día 1, 8, y 15 ya sea como A) PBS (grupo 1), B) antisuero de rata anti-oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄ (5x conc. suero de rata; grupo 2), y C) AVASTIN™ (grupo 3). Suero de rata **Anti-oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄** se obtuvo mediante la inmunización de un número total de 20 ratas macho Whistar en un experimento independiente 4x con dosis de 250 microgramos de humVEGF₂₆₋₁₀₄ usando adyuvante CoVaccine (inoculaciones en los días 0, 14, 28, y 49; sangrado en el día 63). Los sueros de rata resultantes se purificaron por cromatografía de afinidad (columna-ProtG) y se concentraron 5x. Los 10 antisueros más potentes (basados en los datos de neutralización in vitro en el ensayo BaF3; ver el Ejemplo anterior) se mezclaron y usaron para la inoculación de los 10 ratones en el grupo 2 de tratamiento. Las longitudes y amplitudes de los tumores se midieron en días alternos, comenzando el primer día después de la inoculación de la célula tumoral. Los volúmenes tumorales se estimaron usando la fórmula ($amplitud \times longitud$)/2^(ref 6). Los datos se muestran en la Figura 12.

A) Los datos presentados anteriormente conducen a las siguientes conclusiones:

1. Los antisueros **anti-oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄** tiene la capacidad de reducir fuertemente el crecimiento tumoral en ratones.
2. en este contexto experimental, el efecto del tratamiento con los antisueros **anti-oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄** observado fue visiblemente más pronunciado que el de AVASTIN™.
3. el tratamiento de los ratones desnudos con anticuerpos **anti-oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄** fue bien recibido por todos los animales, y por lo tanto no es tóxico!

EJEMPLO 1F: Inmunogenicidad de oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄ en ratas.

Secuencia del péptido oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄:

Acetil-C1RPIETLVDIFQ.EYPDEIEYIFKPSAVPLMRC2AGAC3NDEALE
C4VPTSESNVTMQMIRIKPHQSQHIGEMSFLQHSRC5EC6-amida

Síntesis en fase sólida de ratVEGF₂₆₋₁₀₄. El ratVEGF₂₆₋₁₀₄ se sintetizó mediante síntesis de fase sólida normal en una resina Rink-amida (descargada en 0.1 mmol/g) siguiendo los procedimientos estándar como se describe para humVEGF₂₆₋₁₀₄ (ver Ejemplo 1). La renaturalización oxidativa posterior se llevó a cabo exactamente como se describe para humVEGF₂₆₋₁₀₄. La purificación tanto de red-ratVEGF₂₆₋₁₀₄ y oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄ se llevó a cabo mediante Cromatografía en Líquido de Alta Resolución preparativa (HPLC). La caracterización de ambos péptidos se llevó a cabo por HPLC analítico y espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS). La renaturalización exitosa de red-ratVEGF₂₆₋₁₀₄ se evidenció por el cambio característico de valores de R_f inferiores (a partir del 48.5% a 41.3% ACN, ver Tabla más abajo), normalmente observados cuando las proteínas o fragmentos de las mismas se renaturalizan oxidativamente. La forma estrecha característica del nuevo pico a valores de R_f inferiores proporciona evidencia de que una estructura de nudo de cistina intacta se forma claramente después de la renaturalización oxidativa de red-ratVEGF₂₆₋₁₀₄.

También el espectro ESI-MS sufre un cambio significativo después de la renaturalización oxidativa. En primer lugar, la masa total desciende en 6 unidades de masa (formación de 3 enlaces disulfuro libera un total de 6H). Además, hay un cambio muy característico de señales MS a mayores valores de m/z. Por ejemplo, el espectro-MS para red-ratVEGF₂₆₋₁₀₄ da las más intensas señales para las especies cargadas M⁹⁺ y M¹⁰⁺, mientras que estas señales desaparecen y una señal mucho más débil permanece en M⁵⁺ (ver la Figura 13) que es mucho menos intensa. También este cambio es

característico del plegamiento de las proteínas en su estructura nativa oxidada y muestra que la renaturalización oxidativa de **red-ratVEGF₂₆₋₁₀₄** ha sido un éxito. La razón es que el fragmento de proteína o proteína adopta una estructura más condensada que ya no es capaz de retener muchas cargas. A diferencia de esto, la estructura flexible y prolongada de la proteína reducida es capaz de acomodar muchas más cargas.

Péptido	Estado de oxidación (RED/OX)	Retención (%ACN)	MM calculada	MM experimental
red-ratVEGF₂₆₋₁₀₄	RED (SH) ₆	48.5	9087.5	9085.3
oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄	OX(SS) ₃	41.3	9081.5	9080.0

Este ejemplo describe los resultados de un estudio de la inmunización en las ratas Whistar machos tanto con **oxid-hum-VEGF₂₆₋₁₀₄** como **oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄** con un pliegue intacto de nudo de cistina (forma-oxid). Los datos muestran que de manera inequívoca el **oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄** es igualmente inmunogénico y potente en comparación con el **oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄** en la generación de anticuerpos en ratas. El uso de VEGF truncado descrito en esta patente se puede usar por lo tanto como derivación para evitar la tolerancia inmune a "proteínas propias", como por ejemplo la proteína VEGF homodimérica de longitud completa en este ejemplo en particular.

Un total de 4 ratas Whistar (2x2) se inmunizaron en el día 0 con 250 microgramos cada uno ya sea con **oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄** (2 ratas) o **oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄** (2 ratas) usando CoVaccine como adyuvante, seguido por inoculaciones de refuerzo en los días 14, 28, y 42. Las ratas se desangraron finalmente en el día 56, y los sueros se analizaron para los títulos de anticuerpos contra **ratVEGF₁₋₁₆₅**, **humVEGF₁₋₁₆₅**, **oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄**, y **oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄**. (Parte de) los datos de unión-anticuerpo se muestran en la Tabla 1 y la Figura 14.

Los datos de la Tabla 1 y la Figura 14 no muestran ninguna diferencia detectable en la unión entre los antisueros inducidos con **oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄** y los inducidos con **oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄** en ratas, lo que sugiere fuertemente que **oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄** es igualmente inmunogénica en ratas (especies homólogas) en comparación con **oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄** y es capaz de inducir cantidades comparables de anticuerpos que muestran incluso reactividad cruzada con la proteína **VEGF homodimérico₁₋₁₆₅** (Tabla 1C).

Además, el experimento proporciona una base muy fuerte para el hecho de que **oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄** se puede usar para inducir anti-VEGF en los seres humanos, y que **oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄** no sufrirá por la falta de inmunogenicidad, como resultado de la tolerancia inmune a proteínas propias.

Tabla 1. Lista de la unión de antisueros de rata en ELISA para A) **oxid-ratVEGF₂₆₋₁₀₄**, B) **oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄**, C) **humVEGF₁₋₁₆₅ homodímero** (VEGF humano recombinante de longitud completa), y D) **ratVEGF₁₋₁₆₅ homodímero** (VEGF de rata recombinante de longitud completa). En comparación, se incluyen los datos de unión al AcM anti-humVEGF AVASTIN™ humanizado.

ES 2 545 614 T3

A ratVEGF26-104										
títulos	1/100	1/300	1/1000	1/3000	1/10000	1/30000	1/100000	1/300000	título del sangrado final	
rata 1 (un-oxid-ratVEGF26-104)	3298	3263	3123	3028	2357	1214	514	225	5.1	
rata 2 (un-oxid-ratVEGF26-104)	3597	3424	3262	3197	2516	1241	532	237	5.1	
rata 3 (un-oxid-humVEGF26-104)	3376	3172	3209	3176	2910	1951	861	355	5.3	
rata 4 (un-oxid-humVEGF26-104)	3200	3263	3465	3060	2895	1736	754	349	5.3	
VEGF26-104humano										
B títulos	1/100	1/300	1/1000	1/3000	1/10000	1/30000	1/100000	1/300000	título del sangrado final	
rata 1 (un-oxid-ratVEGF26-104)	3334	3148	3210	3174	2989	1929	811	366	5.3	
rata 2 (un-oxid-ratVEGF26-104)	3297	3121	3564	3329	2801	1871	728	332	5.2	
rata 3 (un oxid-humVEGF26-104)	3263	3098	3385	3300	2908	2188	898	409	5.3	
rata 4 (un-oxid-humVEGF26-104)	3229	3174	3289	3298	3051	2166	873	373	5.3	
Avastin (un-AcM-humVEGF)	4037	3033	1839	736	333	158	116	97	15-25 ng/mL	

VEGF1-165humano										
C títulos	1/100	1/300	1/1000	1/3000	1/10000	1/30000	1/100000	1/300000	título del sangrado final	
rata 1 (un-oxid-ratVEGF26-104)	3404	3320	3449	2681	1305	548	280	158	4.6	
rata 2 (un-oxid-ratVEGF26-104)	3245	3216	3672	2955	1588	955	301	166	4.7	
rata 3 (un-oxid-humVEGF26-104)	3456	3406	3334	3078	1776	739	351	176	4.7	
rata 4 (un-oxid-humVEGF26-104)	3758	3282	3604	3313	2508	1374	510	235	5.1	
Avastin (un AcM-humVEGF)	3261	3016	2493	1322	528	222	129	100	5-10 ng/mL	
ratVEGF1-165										
D títulos	1/100	1/300	1/1000	1/3000	1/10000	1/30000	1/100000	1/300000	título del sangrado final	
rata 1 (un-oxid-ratVEGF26-104)	2993	2519	1481	731	346	172	122	98	3.8	
rata 2 (un-oxid-ratVEGF26-104)	3032	3055	2717	1568	753	315	179	122	4.2	
Avastin (un AcM-humVEGF)	236	148	103	89	93	89	91	88	<1000 ng/mL	

EJEMPLO 1G: Síntesis de humPLGF₃₄₋₁₁₂ (humPLGFtrunc).Secuencia del péptido de **humPLGF₃₄₋₁₁₂**:

5 **Acetil-C1RALERLVDVVSEYPSEVEEHMFSPSAVSLLR**C**2TGAC**C**3GDENL**
 HC4VPVETANVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQHVRC**5EC6-amida**

X0 = acetil10 **X1** = RALERLVDVVSEYPSEVEEHMFSPSAVSLLR (**A**-mutación para nativa**C**)**X2** = TGA (**A**-mutación para nativa **C**)**X3** = GDENLH**X4** = VPVETANVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQHVR**X5** = E15 **X6** = amida

20 **Síntesis en fase sólida de red-PLGF₃₄₋₁₁₂.** **Red-PLGF₃₄₋₁₁₂** se sintetizó mediante síntesis de fase sólida normal en una resina Rink-amida (descargada en 0.1 mmol/g) siguiendo los procedimientos estándar como se describe para **red-humVEGF₂₆₋₁₀₄** (ver Ejemplo 1E). La renaturalización oxidativa posterior se llevó a cabo exactamente como se describe para **oxid-humVEGF₂₆₋₁₀₄**. La purificación tanto de **red-humPLGF₃₄₋₁₁₂** como **oxid-humPLGF₃₄₋₁₁₂** se llevó a cabo mediante Cromatografía en Líquido de Alta Resolución preparativa (HPLC). La caracterización tanto de **red-humPLGF₃₄₋₁₁₂** como **oxid-humPLGF₃₄₋₁₁₂** se llevó a cabo por HPLC analítico como Espectrometría de Masa de Ionización por Electro spray (ESI-MS).

25 La renaturalización exitosa de **red-humPLGF₃₄₋₁₁₂** se evidenció por el cambio característico de valores de R_f inferiores (a partir de 49% a 38.3% ACN, ver Tabla más abajo) que es normalmente observado cuando las proteínas o fragmentos de las mismas se renaturalizan oxidativamente. La forma estrecha característica del nuevo pico a valores de R_f inferiores proporciona evidencia de que una estructura de nudo de cistina intacta se forma claramente después de la renaturalización oxidativa de **red-humPLGF₃₄₋₁₁₂**.

30 También el espectro ESI-MS sufre un cambio significativo después de la renaturalización oxidativa. En primer lugar, la masa total desciende en 6 unidades de masa (formación de 3 enlaces disulfuro libera un total de 6H). Además, hay un cambio muy característico de señales MS a mayores valores de m/z. Por ejemplo, el espectro-MS para **red-humPLGF₃₄₋₁₁₂** da las señales para las especies cargadas M⁶⁺ a M¹⁰⁺ mientras que estas señales desaparecen y una señal mucho más débil permanece en M⁵⁺ (ver la Figura 15) que es mucho menos intensa. También este cambio es característico del plegamiento de las proteínas en su estructura nativa oxidada y muestra que la renaturalización oxidativa de **red-humPLGF₃₄₋₁₁₂** fue exitosa. La razón es que el fragmento de proteína o proteína adopta una estructura más condensada que ya no es capaz de retener muchas cargas. A diferencia de esto, la estructura flexible y prolongada de la proteína reducida es capaz de acomodar muchas más cargas.

40

Péptido	Estado de oxidación (RED/OX)	Retención (%ACN)	MM calculada	MM experimental
red-humPLGF₃₄₋₁₁₂	RED (SH) ₆	48.5	8855.2	8855.3
oxid-humPLGF₃₄₋₁₁₂	OX (SS) ₃	38.3	8849.2	8847.5

50

EJEMPLO 1H: Síntesis de humSOST₅₇₋₁₄₄ (humSOSTtrunc):Secuencia de péptido para humSOST₅₇₋₁₄₄:

55 **Biotina- GGG**C**1RELHFTRYVTDGPCRS**A**KPVTEL**V****C**2SG**Q****C**3G**P**AR**L**L**P****
 NAIGRGKWWRPSGPDFRC**4IPDRYRAQRVQLLCPGG**E**APRARKVRL**V****A****

60 **X0** = biotina-GGG**X1** = RELHFTRYVTDGPCRS**A**KPVTEL**V****X2** = SG**Q****X3** = G**P**AR**L**L**P**NAIGRGKWWRPSGPDFR

X4 = IPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVAS

X5=K

X6 = amida

5 **Síntesis de red-humSOST₅₇₋₁₄₄** no puede realizarse directamente en fase sólida en una resina descargada, como se describe para **humVEGF₂₆₋₁₀₄**. Por lo tanto, los fragmentos más cortos humSOST-F1/3 se sintetizaron y posteriormente ligaron mediante Ligación Química Nativa (NCL) como se describe más abajo. Además, la renaturalización oxidativa posterior de **red-humSOST₅₇₋₁₄₄** completa se llevó a cabo como se describe más abajo. La síntesis en fase sólida de los fragmentos **humSOST-F1/3** se llevó a cabo siguiendo los procedimientos estándar como descrito para **humVEGF₂₆₋₁₀₄**.

10 La condensación de **humSOST-F1/3 por NCL para dar red-humSOST₅₇₋₁₄₄** (para una visión general esquemática ver la Figura 16) Primero, **humSOST-F2** y **humSOST-F3** se disolvieron (2 mg/ml) en la mezcla de reacción de NCL (6 M de guanidina, 20 mM de TCEP, 200 mM de MPAA, 0.2 M de fosfato ácido disódico, ajustado con 10 M de hidróxido sódico a pH 6.5) en una relación de 1.2:1, y reaccionaron durante 24 horas a temperatura ambiente. El **humSOST-F2/3** protegido con tiaprolina se obtuvo en un 66.5% de rendimiento después de la purificación en fase reversa por HPLC. Posteriormente, la tiaprolina se desprotegió con 0.02 M de metoxiamina en tampón de NCL a pH 4.0 durante 60 h. Después, el pH se ajustó a 6.5 y 1.2 equivalentes de **humSOST-F1** se añadió y reaccionó durante 1.5 días. La reacción se controló por RPLC/MS y cada día se añadió 40mM de TCEP para reducir completamente todos los reactivos. Después de la terminación de la reacción, el **red-humSOST₅₇₋₁₄₄** crudo se purificó usando cromatografía de intercambio iónico, y posteriormente por HPLC fase reversa dando **red-humSOST₅₇₋₁₄₄** puro en un 24.2% de rendimiento (16.1% en total).

Estructura de los fragmentos del péptido usados para la condensación del fragmento de SOST₆₇₋₁₄₄ reducido.

25

Nombre	Secuencia del péptido
humSOST₅₇₋₁₄₄	Biotina- GGG <u>C</u> RELHFTRYVTDGPCRSAPVTELV <u>C</u> SGQ C GPARLLPNAIGRGKWWRPSPDFR C IPDRYRAQRVQLL CPGGEAPRARKVRLVAS C K C -amida
humSOST-F1	Biotina- GGG <u>C</u> RELHFTRYVTDGPCRSAPVTELV <u>C</u> SGQ-tioéster
humSOST-F2	BocNH- C (Thz)GPARLLPNAIGRGKWWRPSPDFR-tioéster
humSOST-F3	Amina- <u>C</u> IPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVAS C K C -amida
C = cisteínas implicadas en la formación de nudos de cistina; C = cisteínas que forman enlace SS entre el bucle-1 y el bucle-3 de humSOST	

30

35

40 Renaturalización oxidativa de red-humSOST₅₇₋₁₄₄ para dar oxid-humSOST₅₇₋₁₄₄.

Posteriormente **red-humSOST₅₇₋₁₄₄** se renaturalizó naturalmente disolviendo el péptido (2 mg/ml) en una solución tampón a pH 8.0, que contiene 55 mM de Tris-HCl, 21 mM de cloruro sódico, 0.88 mM de cloruro potásico, 0.48 de L-arginina, 20 mM de Glutación-SH, y 4 mM de Glutación-SS. El péptido se oxidó con el tiempo y rindió un 10.2% de **oxid-humSOST₅₇₋₁₄₄** después de 3.5 días a 4 °C (ver Figura 17).

45

La purificación tanto de **red-humSOST₅₇₋₁₄₄** como **oxid-humSOST₅₇₋₁₄₄** se llevó a cabo mediante la Cromatografía en Líquido de Alta Resolución preparativa (HPLC). La caracterización de ambos compuestos se llevó a cabo por HPLC analítico y Espectrometría de Masa de Ionización por Electro spray (ESI-MS; ver más abajo).

50

55

Péptido	Estado de oxidación (RED/OX)	Retención (%ACN)	MM calculada	MM experimental
red-humSOST₅₇₋₁₄₄	RED (SH) ₈	35.0	10237.2	10235.0
oxid-humSOST₅₇₋₁₄₄	OX (SS) ₄	30.0	10229.2	10229.8
AA₈-humSOST₅₇₋₁₄₄	RED (S-AcNH ₂) ₈	33.0	10694.1	10692.5

15 La renaturalización exitosa de humSOST₅₇₋₁₄₄ se evidenció por el cambio característico de valores de Rf inferiores (a partir de 35% a 30% ACN, ver Tabla más abajo) que es normalmente observado cuando las proteínas o fragmentos de las mismas se renaturalizan oxidativamente. La forma estrecha característica del nuevo pico a valores de Rf inferiores proporciona evidencia de que una estructura de nudo de cistina intacta se forma claramente después de la renaturalización oxidativa.

20 También el espectro ESI-MS sufre un cambio significativo después de la renaturalización oxidativa. En primer lugar, la masa total desciende en 8 unidades de masa (formación de 4 enlaces disulfuro libera un total de 8H). Además, hay un cambio muy característico de señales MS a mayores valores de m/z. Por ejemplo, el espectro-MS para **red-humSOST₅₇₋₁₄₄** da señales claras para las especies cargadas M⁸⁺ a M¹²⁺, mientras que estas señales desaparecen y una señal mucho más débil permanece en M⁶⁺ y M⁷⁺ (ver la Figura 18D) que es mucho menos intensa. También este cambio es característico del plegamiento de las proteínas en su estructura nativa oxidada y muestra que la renaturalización oxidativa de red-humSOST₅₇₋₁₄₄ fue exitosa. La razón es que el fragmento de proteína o proteína adopta una estructura más condensada que ya no es capaz de retener muchas cargas. A diferencia de esto, la estructura flexible y prolongada de la proteína reducida es capaz de acomodar muchas más cargas.

30 Para demostrar, además, que el **oxid-humSOST₅₇₋₁₄₄** adopta un pliegue nativo con nudo de cistina, se presentan los datos de unión de una serie de 3 AcMs que se seleccionaron a partir de genotecas de expresión de fagos usando **oxid-humSOST₅₇₋₁₄₄**. Se demostró que los 3 anticuerpos anti-**oxid-humSOST₅₇₋₁₄₄**

- se unen fuertemente a **oxid-humSOST₅₇₋₁₄₄** en el ELISA.
- 35 • se une fuertemente a humSOST/esclerostina recombinante de longitud completa en el ELISA.
- no se unen en absoluto a **AA₈-humSOST₅₇₋₁₄₄** en el ELISA.
- no se unen a ninguna de las tres, proteínas no relacionadas en el ELISA.

40 En general, estos datos muestran que el **oxid-humSOST₅₇₋₁₄₄** se puede usar en lugar de humSOST/esclerostina de longitud completa para seleccionar los anticuerpos a partir de las genotecas de expresión de fagos (PDLs), que muestran selectividad total y especificidad a humSOST/esclerostina de longitud completa con respecto a las proteínas no relacionadas, y que el **oxid-humSOST₅₇₋₁₄₄** puede, por lo tanto, usarse como un mímico de proteína de "fácil disponibilidad" de **humSOST/esclerostina de longitud completa** con fines de generación y selección de anticuerpos.

45 **EJEMPLO 11.** Síntesis de humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇(quimérico de humTGFB2-humVEGFtrunc)

En este ejemplo, se demuestra la síntesis del mímico de proteína truncado del oxid-humTGFB2₁₅₋₁₁₁, en el que el bucle beta2 (28 aminoácidos de longitud; **X3** en la secuencia general) se reemplazó por el humVEGF bucle-beta2 (aa 62-67). La síntesis y plegado oxidativo (nudo de cistina) exitoso de **TGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇** sirve principalmente como un ejemplo para demostrar que el intercambio de secuencias del bucle beta2 entre diferentes proteínas con nudo de cistina conduce generalmente a péptidos quiméricos que retienen la capacidad de formar un **plegado de nudo de cistina**, intacto al igual que el observado para los péptidos truncados completamente homólogos (ver otros ejemplos).

55 Secuencia peptídica del humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇:

**Acetil-C1ALRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFC2AGAC3NDEGLE
C4VSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSC5KC6-amida**

60 **X0** = acetil
X1 = ALRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANF (A-mutación para nativo **C**)

X2 = AGA

X3 = NDEGLE (beta2-secuencia del bucle de humVEGF-A; aa 62-67)

X4 = VSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKS

X5 = K

5 X6 = amida

Síntesis en fase sólida de red-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇.

10 **Red-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇** se sintetizó mediante síntesis de fase sólida normal en una resina Rink-amida (descargada en 0.1 mmol/g) siguiendo los procedimientos estándar como se describe para **humVEGF₂₆₋₁₀₄** (ver Ejemplo 1). La renaturalización oxidativa posterior se llevó a cabo exactamente como se describe para **humVEGF₂₆₋₁₀₄**. La purificación tanto de red- como **oxid-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇** se llevó mediante Cromatografía en Líquido de Alta Resolución preparativa (HPLC). La caracterización tanto de red- como **oxid-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇** se llevó a cabo por HPLC analítico y espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS).

15 La renaturalización exitosa de **red-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇** se evidenció por el cambio característico de valores de Rf inferiores (a partir del 46.8% a 42.0% ACN, ver Tabla más abajo) (ver otros ejemplos). La forma estrecha característica del nuevo pico a valores de Rf inferiores proporciona evidencia de que una estructura de nudo de cistina intacta se forma claramente. También el espectro ESI-MS sufre un cambio significativo después de la renaturalización oxidativa. En primer lugar, la masa total desciende en 6 unidades de masa (formación de 3 enlaces disulfuro libera un total de 6H). Además, hay un cambio muy característico de señales MS a mayores valores de m/z. Por ejemplo, el espectro-MS para **red-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇** da señales claras para las especies cargadas M⁶⁺ a M¹¹⁺, mientras que estas señales desaparecen y una señal mucho más débil permanece en M⁵⁺ (ver Figura 20) que es mucho menos intensa. También este cambio es característico del plegamiento de las proteínas en su estructura nativa oxidada y muestra que la renaturalización de **humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇** fue exitosa. La razón es que el fragmento de proteína o proteína adopta una estructura más condensada que ya no es capaz de retener muchas cargas. A diferencia de esto, la estructura flexible y extendida de **red humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇** es capaz de acomodar muchas más cargas.

30

Péptido	Estado de oxidación (RED/OX)	Retención (%ACN)	MM calc.	MM exper.
red-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇	RED	46.8	8498.1	8500.2
oxid-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇	OX	42.0	8492.1	8490.5

35

40 Para demostrar que **oxid-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇** se puede usar para generar anticuerpos anti-TGF-B2 a través de la inmunización, se lleva a cabo un experimento de inmunización en 2 ratas. Cada animal recibió 4 inoculaciones (0, 2, 4 y 7.5 semanas) con 2x450 + 2x130 microgramos de **oxid-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇**. El análisis de los antisueros (wpv) a las 9 semanas después de la vacunación (Figura 21) mostró una fuerte unión en ELISA con TGF-B2 de longitud completa (títulos de 3.8 y 4.1) en comparación con los sueros preinmunes (≤2.1) lo que indica que los anticuerpos específicos para TGF-B2 se generaron después de la inmunización. Además, se observó que la mayoría de los anticuerpos en el suero se dirigieron hacia la parte TGFB2 del péptido en el **oxid-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇** más bien hacia la parte VEGF (**humVEGF₆₂₋₆₇**). Esto indica que la secuencia **humVEGF₆₂₋₆₇** es un buen sustituto mucho más largo para el bucle b2 de humTGFB2 (28 aminoácidos), pero que no altera la producción de anticuerpos específicos contra humTGF-B2, ni la renaturalización oxidativa de **red-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇** en **oxid-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇**. Estos datos demuestran que **oxid-humTGFB2_{15-111/Δ49-77}-humVEGF₆₂₋₆₇** se puede usar como un sustituto de TGF-B2 para obtener anticuerpos anti-humTGFB2 que presentan reactividad cruzada completa con la proteína nativa de humTGF-B2.

50

Referencias

1. Vitt UA, Sheau YH, Hsueh AJW, "Evolution and Classification of Cystine Knot-containing Hormones and Related Extracellular Signaling Molecules", *Mol. Endocrin.* **2001**, *15*, 681-94.
- 5 2. Tamaoki H, Miura R, Kusunoki M, Kyogoku Y, Kobayashi Y, Moroder L, "Folding motifs induced and stabilized by distinct cystine frameworks", *Prot. Engin.* 1998, *11*, 649-59.
3. Isaacs NW, "Cystine Knots", *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 391-5.
4. McDonald N, Hendrickson WA, "A structural superfamily of growth factors containing a cystine-knot motif" *Cell* **1993**, *73*, 421-4.
- 10 5. Bork P, "The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor" *FEBS* **1993**, *327*, 125-130
6. Tomayko MM, Reynolds CP, "Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice" *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1989**, *24*, 148-156.

15

Reivindicaciones

1. Mímico de proteína de un miembro la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, dicho mímico de proteína que es capaz de inducir una respuesta inmune contra dicho miembro y que tiene el motivo X0-C1-X1-C2-X2-C3-X3-C4-X4-C5-X5-C6-X6, en donde C1 a C6 son residuos de cisteína que forma una estructura con nudo de cistina en la que C1 se enlaza a C4, C2 se enlaza a C5 y C3 se enlaza a C6, y en donde X0 y X6 representan, independientemente una de otra una secuencia de aminoácidos con una longitud de 0 a 10 aminoácidos, X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 2 a 24 residuos de aminoácidos con al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos localizada entre C2 y C3 de un miembro la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 residuo de aminoácidos, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 15 a 50 aminoácidos con al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos localizada entre C1 y C2 de un miembro la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 3 a 36 aminoácidos con al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos localizada entre C3 y C4 de un miembro la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 15 a 50 aminoácidos con al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos localizada entre C4 and C5 de un miembro la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, y en donde al menos una cisteína en cualquiera de las secuencias representadas por X1, X2, X3, X4 y X6 se reemplaza por otro residuo de aminoácidos.

2. Un mímico de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X1, X2, X3 y X4 representan cada una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos del mismo miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina.

3. Un mímico de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X1 representa una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina y en donde X2, X3 y/o X4 representa una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de al menos un otro miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, preferentemente en donde dicho mímico de proteína consiste en la secuencia de aminoácidos:

C1ALRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFC2AGAC3NDEGLEC4VSQDLEPLTIL
YYIGKTPKIEQLSNMIVKSC5KC6 (TGFB_{215-111/Δ49-77}-VEGF₆₂₋₆₇).

4. Un mímico de proteína de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-3, en donde X2 tiene la secuencia de aminoácidos X2a-G-X2b, en donde X2a es cualquier aminoácido o ninguno, G es glicina, y X2b es cualquier aminoácido.

5. El mímico de proteína de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro seleccionado del grupo consistente de la subfamilia de la hormona de la glicoproteína beta (GLHB), la subfamilia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la subfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), la subfamilia del factor de crecimiento nervioso (NGF), la subfamilia de la hormona de la glicoproteína-alfa (GLHA), la subfamilia de CTCK, la subfamilia tipo Noggin, la subfamilia tipo mucina, la subfamilia antagonista de BMP tipo mucina, la subfamilia hemolectina tipo mucina, la subfamilia de tipo-Slit, y la subfamilia tipo-Jagged.

6. El mímico de proteína de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-5, que comprende al menos una de las secuencias consenso:

- [GSRE]C3[KRL]G[LIVT][DE]XXX[YW]XSXC4;
 - P[PSR]CVXXXRC2[GSTA]GCC3;
 - [LIVM]XXPXX[FY]XXXC2XGXC3;
 - C2[STAGM]G[HFYL]C3X[ST];
 - [PA]VAXXC5XC6XXCXXX[STDAI][DEY]C;
 - C2XGCC3[FY]S[RQS]A[FY]PTP; o
 - CC4(X)₁₃C(X)₂[GN](X)₁₂C5XC6(X)_{2,4}C;
 en donde

C2 a C6 son residuos de cisteína que son parte de una estructura con nudo de cistina;
 X significa cualquier aminoácido;

[GSRE] significa G o S o R o E ; [KRL] significa K o R o L;

[LIVT] significa L o I o V o T; [DE] significa D o E ; [YW] significa Y o W;

[PSR] significa P o S o R; [GSTA] significa G o S o T o A;

[LIVM] significa L o I o V o M; [FY] significa F o Y;

[STAGM] significa S o T o A o G o M; [HFYL] significa H o F o Y o L;

[ST] significa S o T; [PA] significa P o A; [STDAI] significa S o T o D o A o I;

[DEY] significa D o E o Y; [GN] significa G o N; [RQS] significa R o Q o S;

(X)₁₃ significa una secuencia de 13 aminoácidos; (X)₂ significa una secuencia de 2 aminoácidos; (X)₁₂ significa una secuencia de 12 aminoácidos y (X)_{2,4} significa una secuencia de 2, 3 o 4 aminoácidos.

7. El mímico de proteína de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 3 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 29 a 32 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 6 a 12 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 32 a 41 aminoácidos, preferentemente en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es el factor de crecimiento placentario (PLGF), y en donde dicho mímico de proteína consiste de la secuencia de aminoácidos

**C1RALERLVDVSEYPSEVEHMFSPSAVSLRC2TGAC3GDENLHC4VPVETANVT
MQLLKIRSGDRPSYVELTFSQHVRC5EC6 (PLGF₃₄₋₁₁₂).**

8. El mímico de proteína de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho miembro es el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (hVEGF), y en donde X0 comprende la secuencia de aminoácidos KFMDVYQRSY, X1 comprende la secuencia de aminoácidos HPIETLVDIFQEYDIEIYIFKPSAVPLMR, X2 comprende la secuencia de aminoácidos GGA, X3 comprende la secuencia de aminoácidos NDEGLE, X4 comprende la secuencia de aminoácidos VPTEESNITMQIMRIKPHQGHIGEMSFLQHNC, X5 comprende la secuencia de aminoácidos E, y X6 comprende la secuencia de aminoácidos RPKKDRARQE, o en donde dicho mímico de proteína consiste de la secuencia de aminoácidos

**C1HPIETLVDIFQEYDIEIYIFKPSAVPLMRC2GGAC3NDEGLEC4VPTEESNITM
QIMRIKPHQGHIGEMSFLQHNC5EC6 (VEGF₂₆₋₁₀₄).**

9. El mímico de proteína de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia de la hormona de la glicoproteína beta (GLHB), y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 3 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 23 a 28 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 18 a 20 aminoácidos, and X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 30 a 33 aminoácidos, o en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia de la hormona de la glicoproteína alfa (GLHA), y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 3 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 13 a 17 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 27 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 20 a 21 aminoácidos, o en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia del factor de crecimiento nervioso (NGF), y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 9 a 24 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 41 a 44 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 11 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 27 o 28 aminoácidos, o en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 3 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 23 a 41 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 18 a 36 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 27 a 34 aminoácidos.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
10. El mímico de proteína de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia de tipo Noggin, y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 4 a 6 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 22 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 7 a 9 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 35 a 98 aminoácidos, o en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia de tipo coagulina, y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 7 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 38 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 5 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 29 aminoácidos, o en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia de tipo Jagged, y en donde X2 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 3 aminoácidos, X5 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 1 aminoácido, X1 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 32 aminoácidos, X3 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 25 aminoácidos, y X4 representa una secuencia de aminoácidos con una longitud de 26 aminoácidos.
 11. El mímico de proteína de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-10, en donde dicho mímico de proteína comprende la secuencia C1-X1-C2-X2-C3-X3-C4-X4-C5-X5-C6, en donde dicha secuencia tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia consenso seleccionada de las secuencias 1 a 145 de la Figura 10.
 12. Composición farmacéutica o inmunogénica que comprende un mímico de proteína de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-11 y un portador farmacéuticamente aceptable, diluyente y/o excipiente preferentemente una composición de dicho mímico de proteína se acopla a un portador inmunogénico, preferentemente toxina diftérica (DT) y/o hemocianina de lapa californiana (KLH).
 13. Uso de un mímico de proteína de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-11 para la preparación de un medicamento y/o agente profiláctico para el tratamiento y/o prevención de un trastorno asociado con un miembro la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina.
 14. Uso de un mímico de proteína de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-11 para la preparación de un medicamento y/o agente profiláctico para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad asociada al tumor y/o degeneración macular relacionada con la edad (AMD), en donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia VEGF o la subfamilia TGF-beta.
 15. Un método para producir anticuerpos contra un miembro la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, que comprende administrar un mímico de proteína de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-11 y/o una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 12 a un animal no-humano, y obtener anticuerpos contra un miembro la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, cuyos anticuerpos se producen por dicho animal.
 16. Un mímico de proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1-11 y/o una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 12 y/o un anticuerpo obtenible por un método de la reivindicación 15, o una parte funcional o equivalente funcional de dicho anticuerpo, para uso como anticonceptivo hembra/macho, donde dicho miembro de la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina es un miembro de la subfamilia GLHA o GLHB.
 17. Uso de un mímico de proteína de acuerdo con cualquier una de las reivindicaciones 1-11 para la elaboración de un medicamento para la neutralización de un anticuerpo dirigido a un miembro la superfamilia del factor de crecimiento con nudo de cistina, preferentemente en donde dicho anticuerpo es Avastin™ y dicho mímico de proteína es oxid-VEGF₂₆₋₁₀₄.

Figura 1

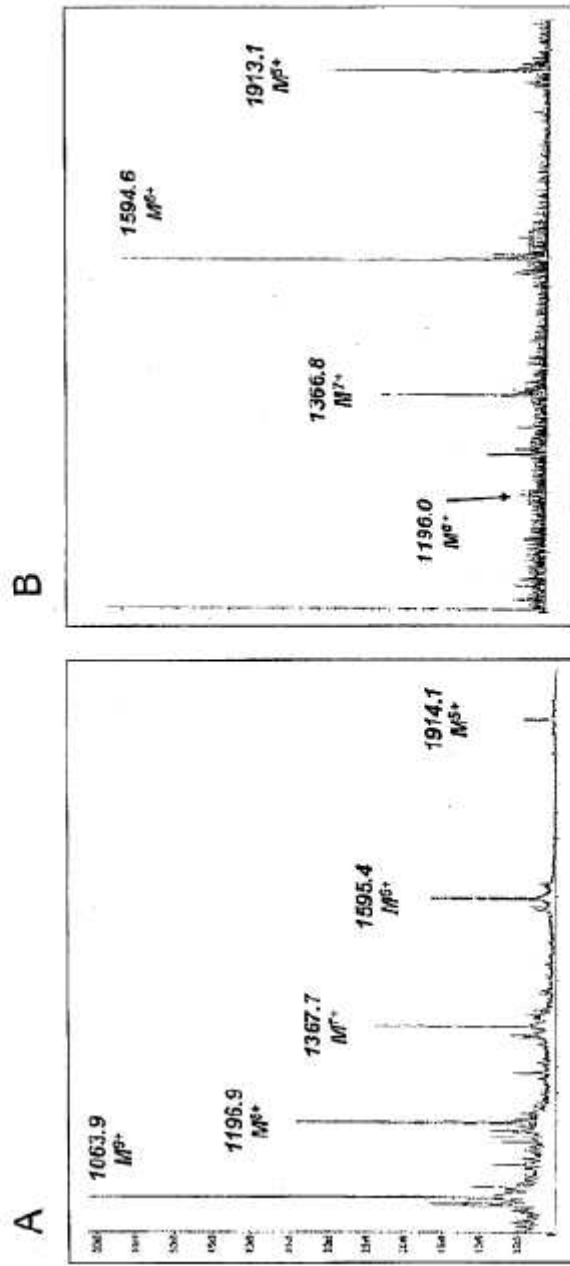


Figura 2

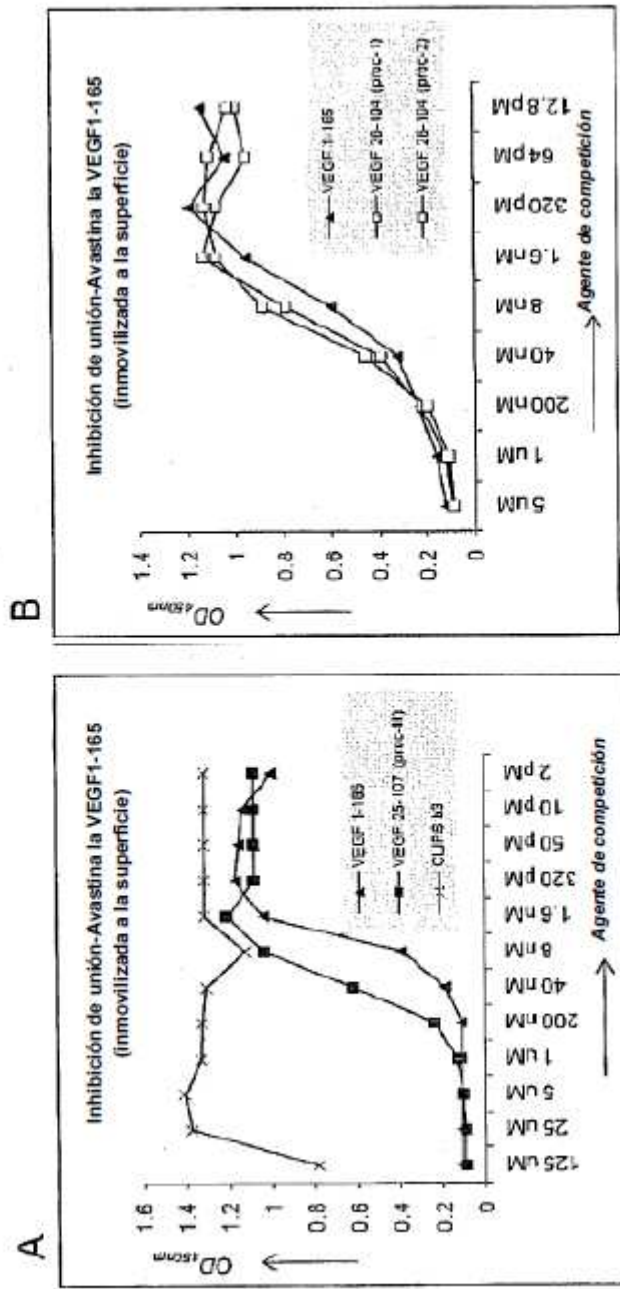


Figura 3

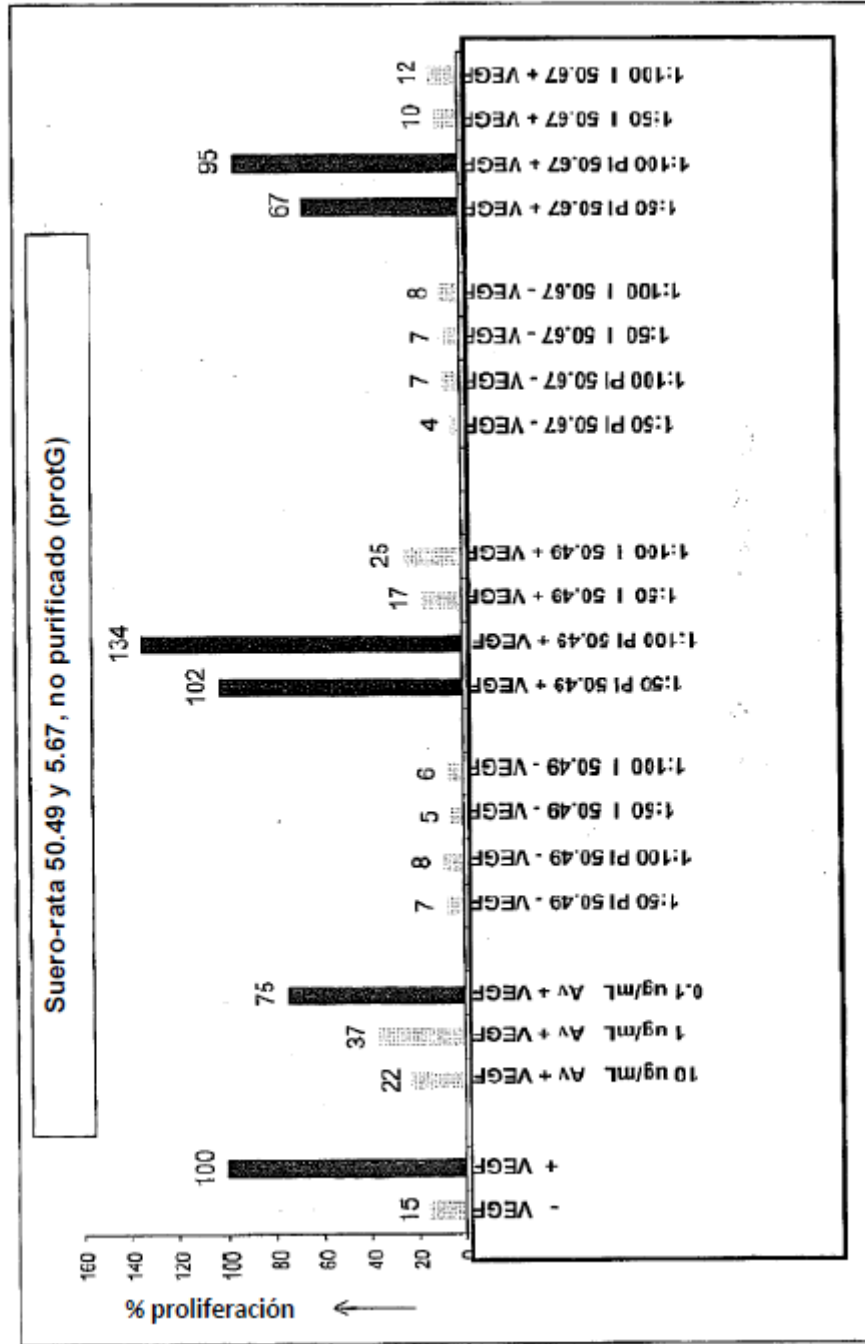


Figura 4

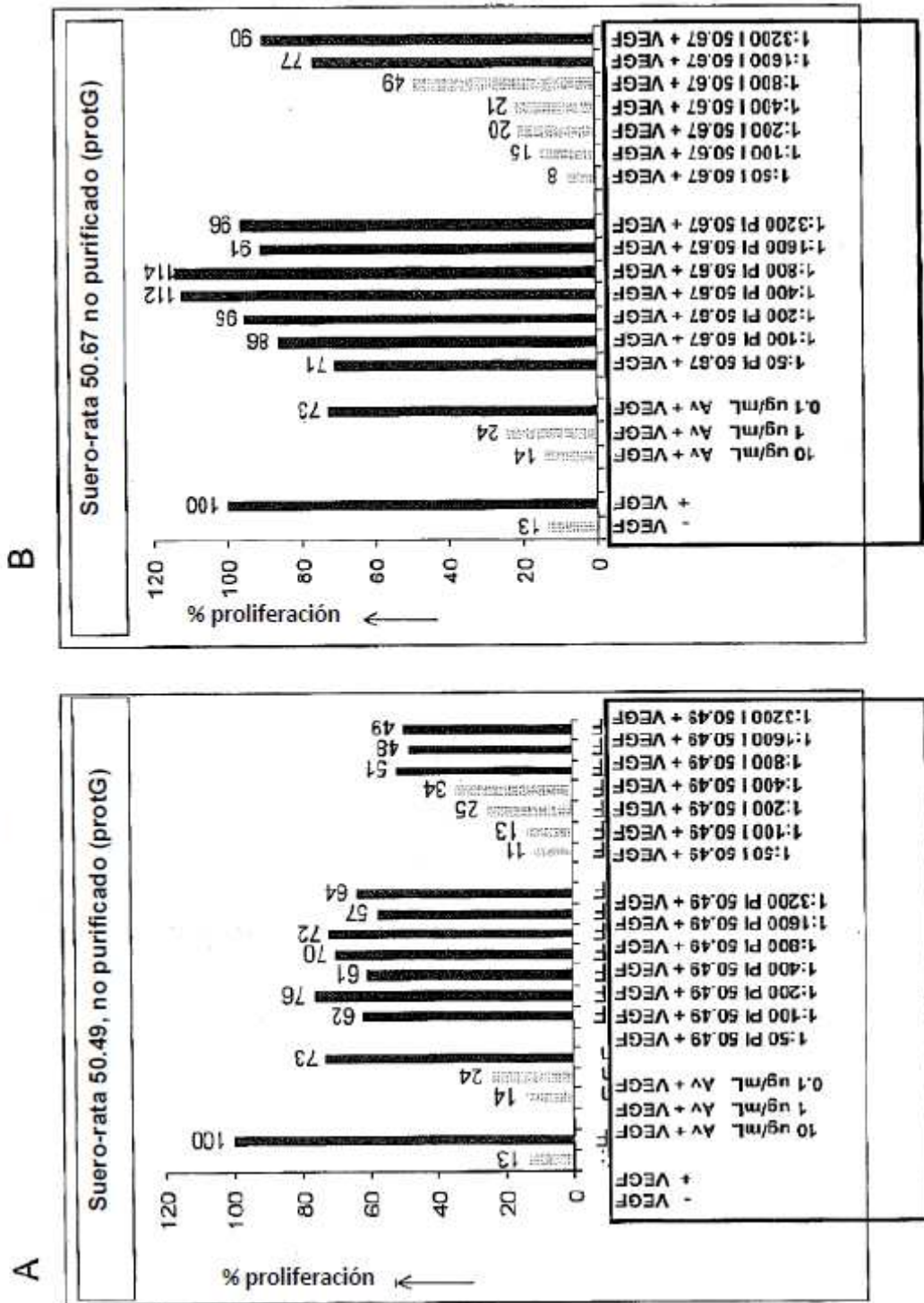


Figura 5

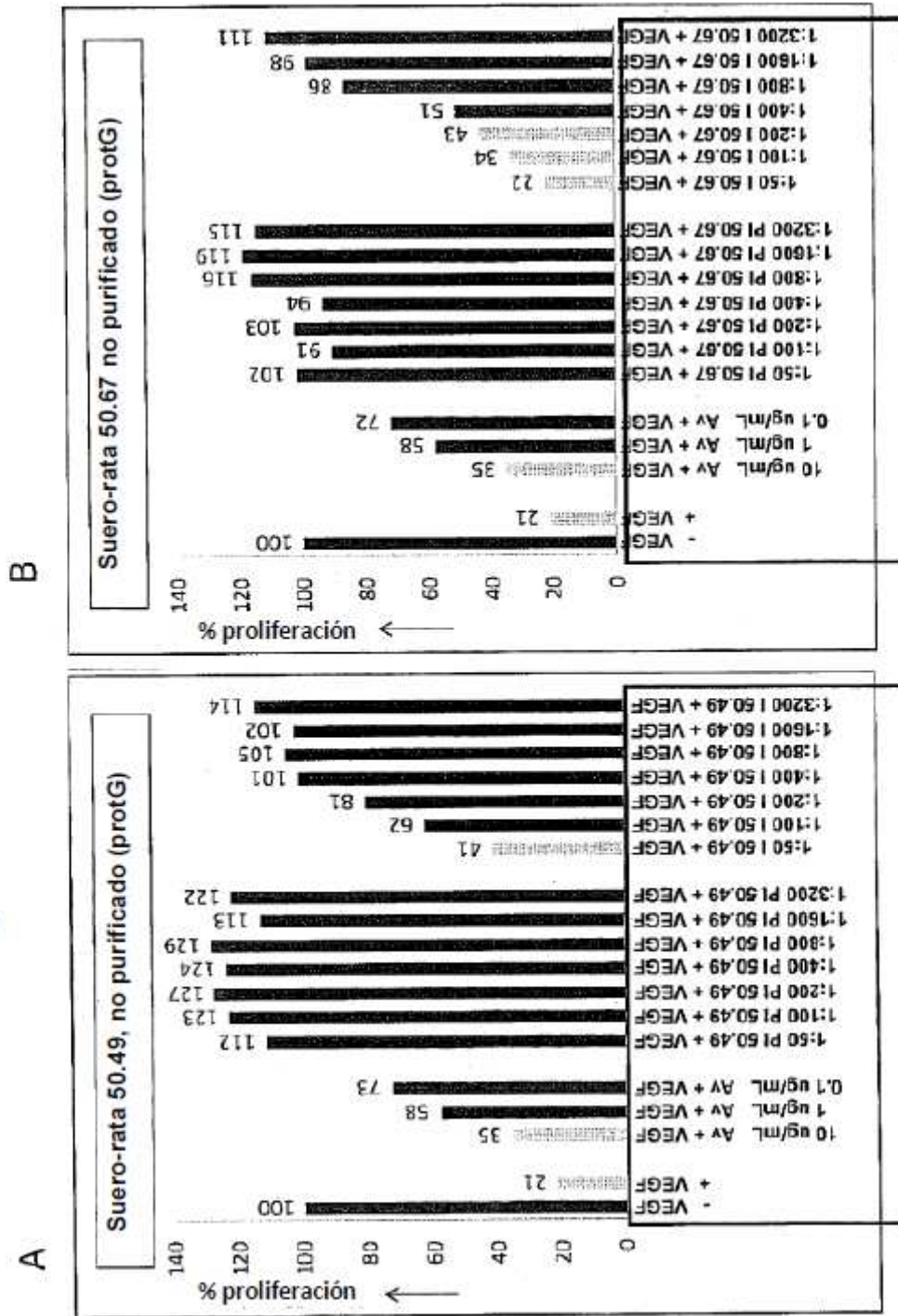


Figura 6

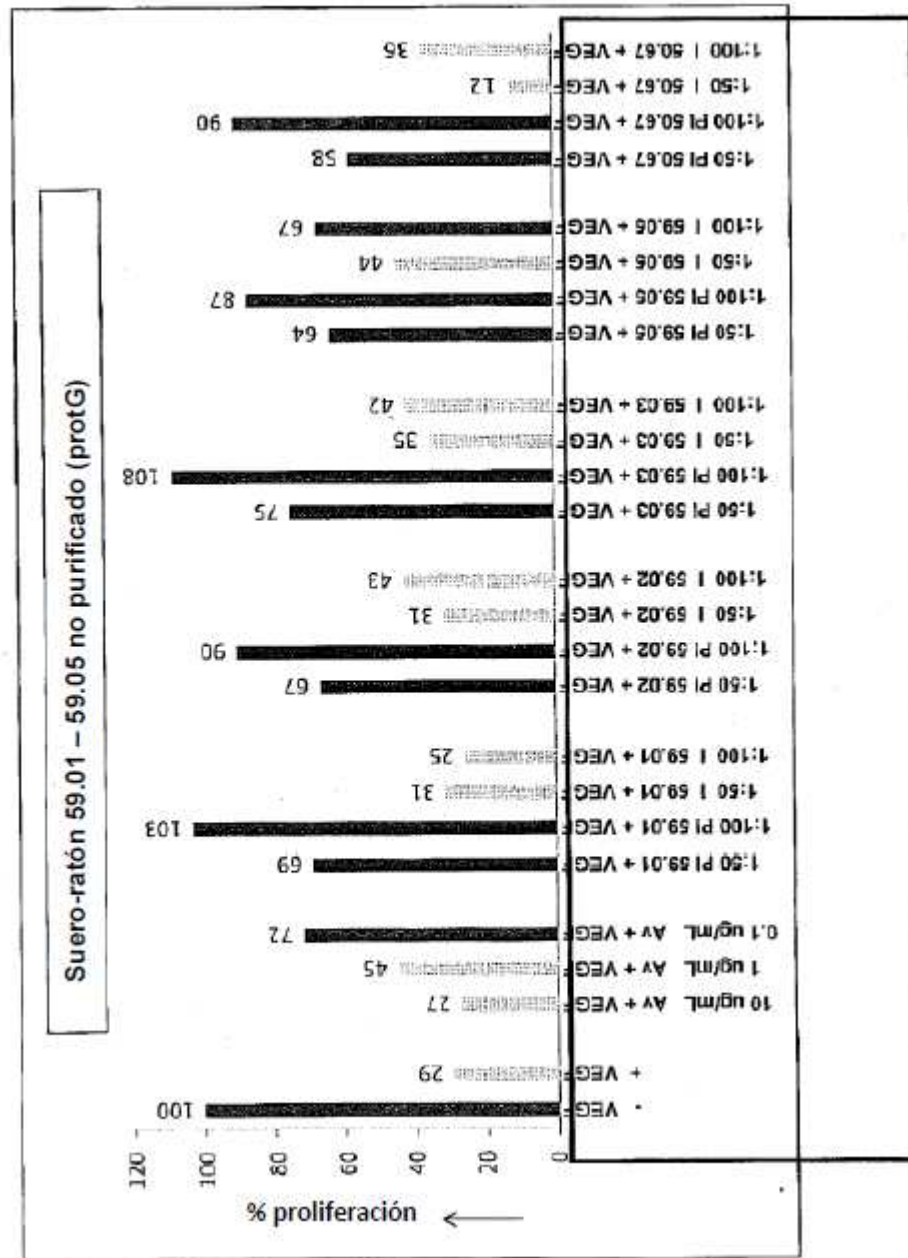


Figura 7

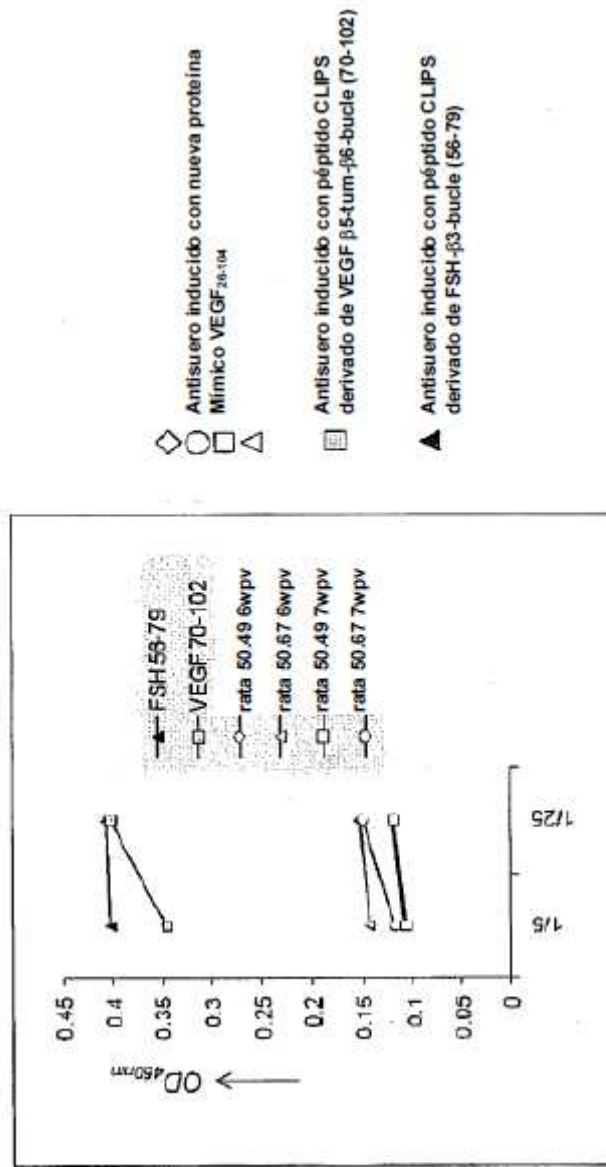


Figura 8

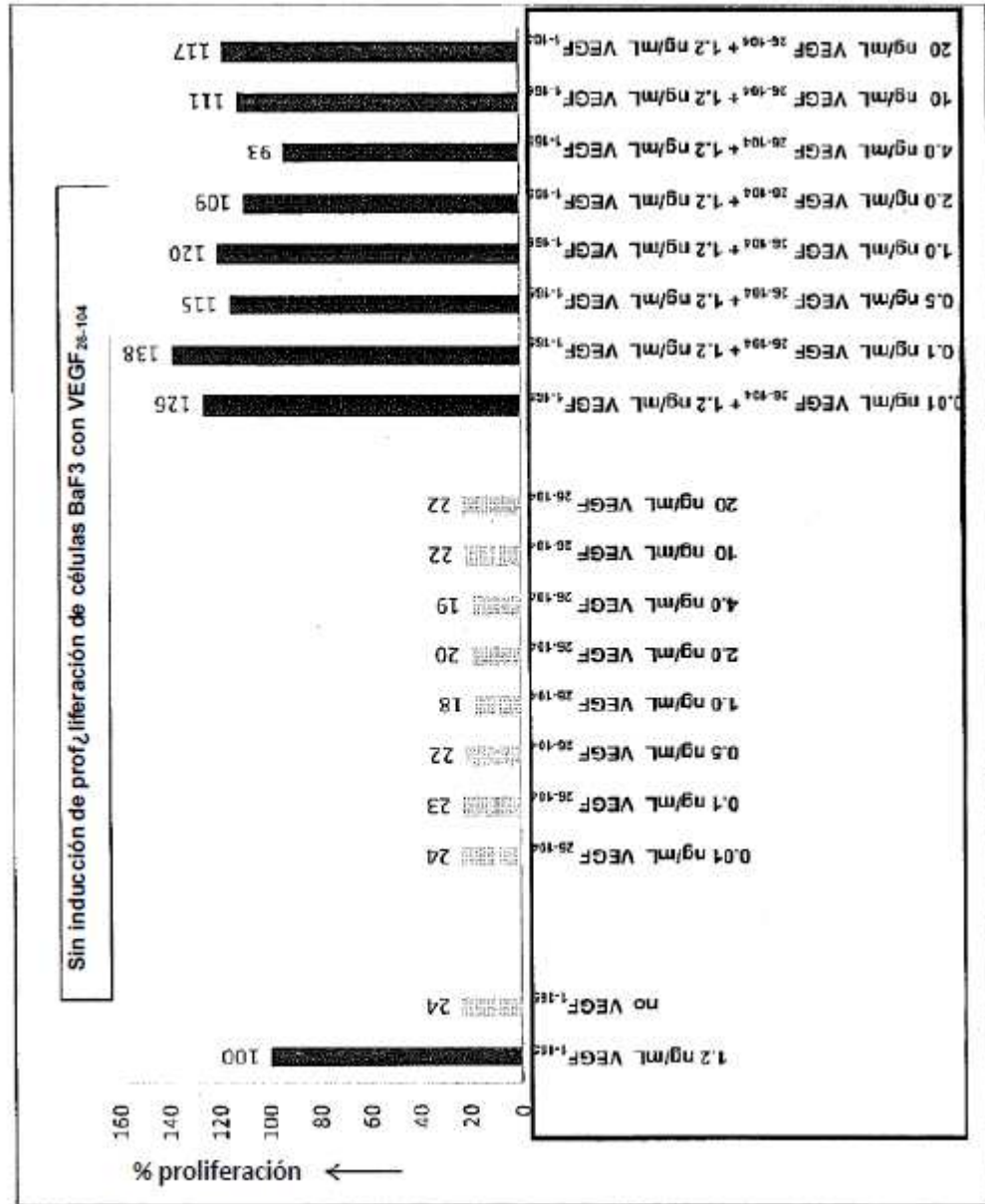


Figura 9

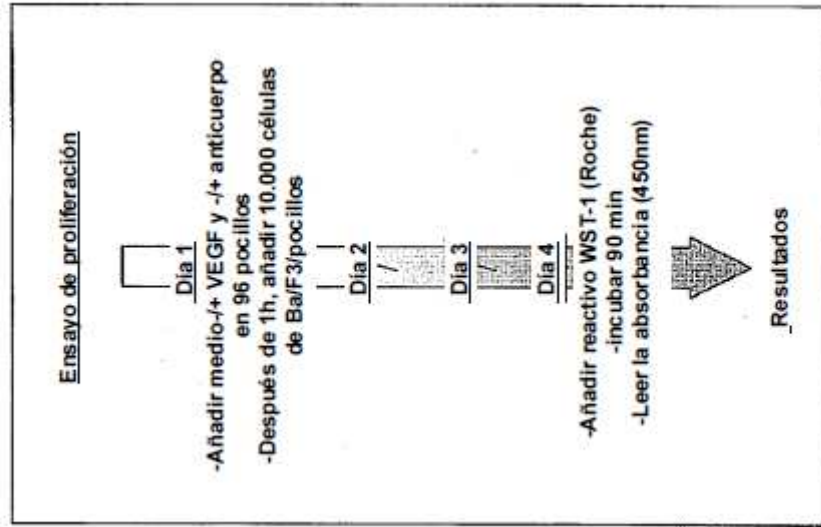


Figura 10 (Información General)

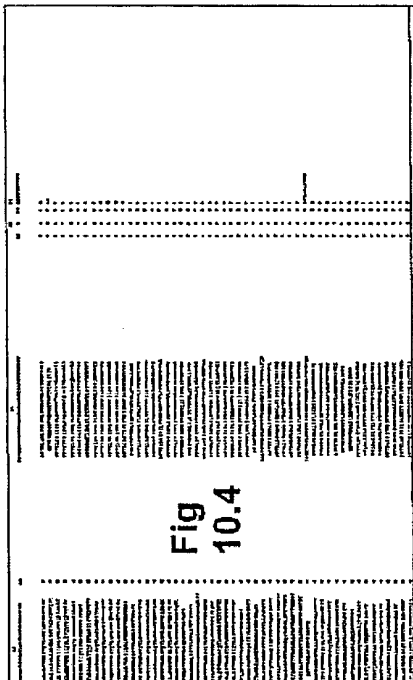
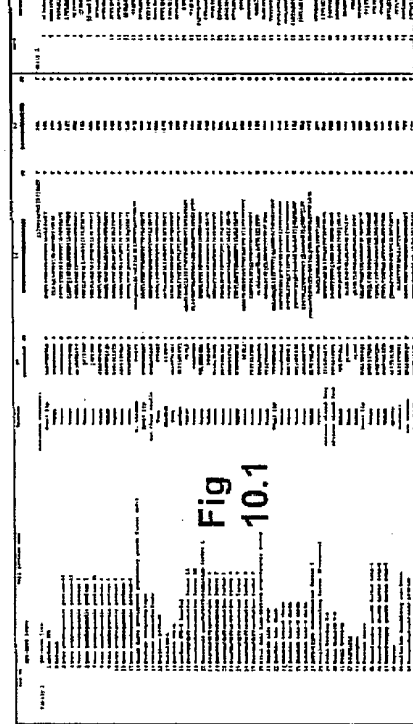
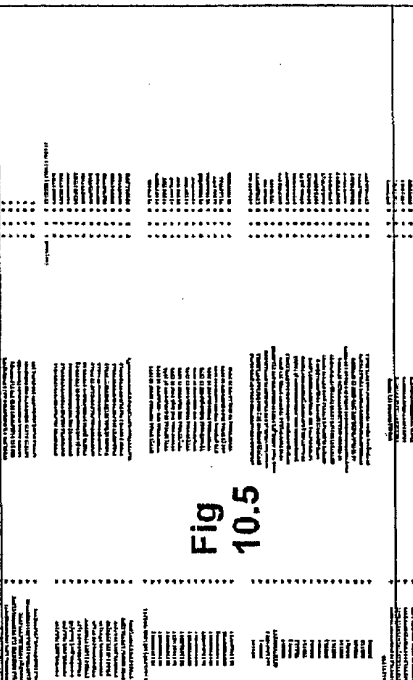
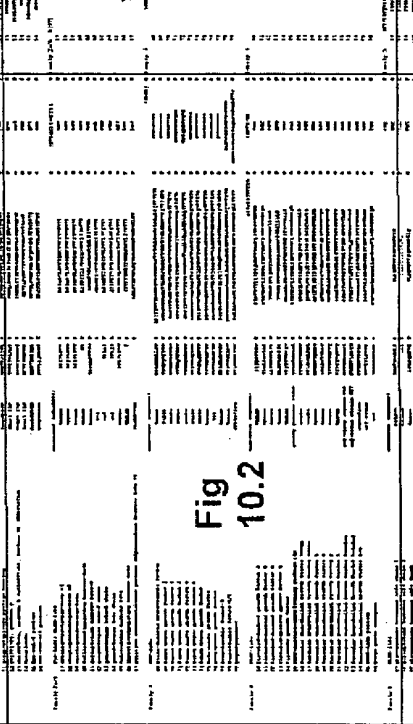
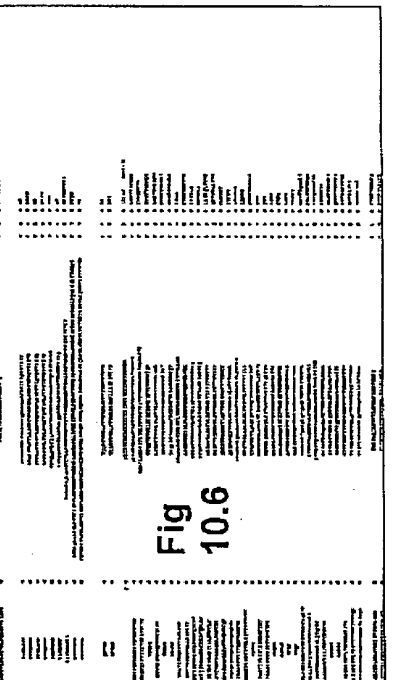
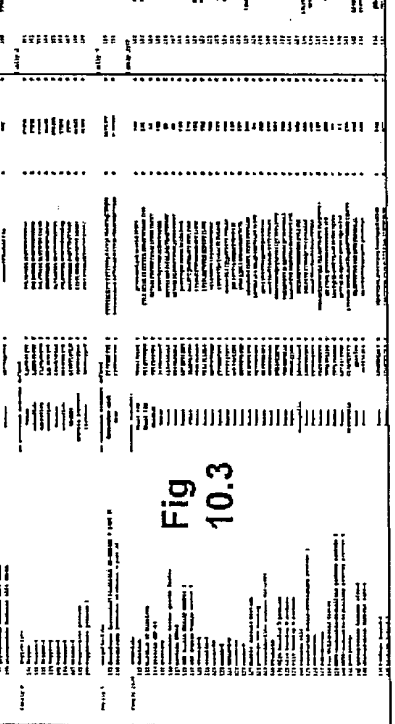
 <p>Fig 10.1</p>	 <p>Fig 10.2</p>	 <p>Fig 10.3</p>	 <p>Fig 10.4</p>	 <p>Fig 10.5</p>	 <p>Fig 10.6</p>
--	---	---	--	--	---

Figura 10.1

Seq Nr.	Full protein name	Species	Accession	Accession	Accession	Accession
			X0	X1	X2	X3
1	TGF-beta like	common mouse	U00000	U00000	U00000	U00000
2	Artemin	human	U00000	U00000	U00000	U00000
3	Bone morphogenetic protein 10	human	U00000	U00000	U00000	U00000
4	Bone morphogenetic protein 15	human	U00000	U00000	U00000	U00000
5	Bone morphogenetic protein 2	human	U00000	U00000	U00000	U00000
6	Bone morphogenetic protein 3	human	U00000	U00000	U00000	U00000
7	Bone morphogenetic protein 3b	human	U00000	U00000	U00000	U00000
8	Bone morphogenetic protein 4	human	U00000	U00000	U00000	U00000
9	Bone morphogenetic protein 5	human	U00000	U00000	U00000	U00000
10	Bone morphogenetic protein 6	human	U00000	U00000	U00000	U00000
11	Bone morphogenetic protein 7	human	U00000	U00000	U00000	U00000
12	Bone morphogenetic protein-8	human	U00000	U00000	U00000	U00000
13	Dauer larva development regulatory growth factor dat-1	C. elegans	U00000	U00000	U00000	U00000
14	Protein decapentaplegic	fruit fly	U00000	U00000	U00000	U00000
15	Protein decapentaplegic	red flour beetle	U00000	U00000	U00000	U00000
16	Dorsiers protein	chicken	U00000	U00000	U00000	U00000
17	Dorsalin-1	frog	U00000	U00000	U00000	U00000
18	Protein DVR-1	urchin	U00000	U00000	U00000	U00000
19	Protein DVR-1 homolog	human	U00000	U00000	U00000	U00000
20	Growth/differentiation factor 11	human	U00000	U00000	U00000	U00000
21	Growth/differentiation factor 15	human	U00000	U00000	U00000	U00000
22	Embryonic growth/differentiation factor 1	human	U00000	U00000	U00000	U00000
23	Growth/differentiation factor 2	human	U00000	U00000	U00000	U00000
24	Growth/differentiation factor 3	human	U00000	U00000	U00000	U00000
25	Growth/differentiation factor 5	human	U00000	U00000	U00000	U00000
26	Growth/differentiation factor 6	human	U00000	U00000	U00000	U00000
27	Growth/differentiation factor 7	human	U00000	U00000	U00000	U00000
28	Growth/differentiation factor 8	human	U00000	U00000	U00000	U00000
29	Growth/differentiation factor 9	human	U00000	U00000	U00000	U00000
30	Olfactin	fruit fly	U00000	U00000	U00000	U00000
31	Inhibin alpha chain	human	U00000	U00000	U00000	U00000
32	Inhibin beta chain	human	U00000	U00000	U00000	U00000
33	Inhibin beta-A chain	human	U00000	U00000	U00000	U00000
34	Inhibin beta-B chain	human	U00000	U00000	U00000	U00000
35	Inhibin beta-C chain	human	U00000	U00000	U00000	U00000
36	Inhibin beta-t chain	human	U00000	U00000	U00000	U00000
37	Left-right determination factor 2	human	U00000	U00000	U00000	U00000
38	Neuroleptin-inhibiting factor (Neuroleptin)	human	U00000	U00000	U00000	U00000
39	Notch homolog 2-A	African clawed frog	U00000	U00000	U00000	U00000
40	Notch homolog 4-A	African clawed frog	U00000	U00000	U00000	U00000
41	Notch homolog	human	U00000	U00000	U00000	U00000
42	Notch homolog	human	U00000	U00000	U00000	U00000
43	Notch homolog	human	U00000	U00000	U00000	U00000
44	Notch homolog	human	U00000	U00000	U00000	U00000
45	Transforming growth factor beta-1	human	U00000	U00000	U00000	U00000
46	Transforming growth factor beta-2	human	U00000	U00000	U00000	U00000
47	Transforming growth factor beta-3	human	U00000	U00000	U00000	U00000
48	Onivin	urchin	U00000	U00000	U00000	U00000
49	Neuroleptin-inhibiting factor	human	U00000	U00000	U00000	U00000
50	Decapentaplegic-like protein	sea anemone	U00000	U00000	U00000	U00000
51	Decapentaplegic protein homolog	roundworm	U00000	U00000	U00000	U00000

Figure 10.2

Accession	Gene Name	Protein Name	Species	Accession	Gene Name	Protein Name	Species
52	CG1907-20, isoform 8		Fruit fly				
53	CG1997-20, isoform A (CG144433p)		Fruit fly				
54	hyaluronin		Fruit fly				
55	CGR-CBL-1 protein		roundworm				
56	C3A-UIC-129 protein		roundworm				
Family 2a/b							
	Cys-hoof1 (CUB-like)		condensin sequence				
57	chordinadomorphin-beta v1		human				
58	chordinadomorphin-beta v2		human				
59	chordinadomorphin-beta		human				
60	follicle-stimulating hormone-beta		human				
61	glycoprotein hormone beta-5		human				
62	gonadotropin beta-1 chain		owl				
63	gonadotropin beta-2 chain		owl				
64	gonadotropin beta chain		human				
65	lutealizing hormone beta		human				
66	thyroid-stimulating hormone beta		human				
67	putative uncharacterized protein (glycoprotein hormone beta 5)		roundworm				
Family 3							
	Npr-like		condensin sequence				
68	brain-derived neurotrophic factor		human				
69	venom nerve growth factor 1		viper				
70	venom nerve growth factor 2		snake				
71	venom nerve growth factor 3		snake				
72	venom nerve growth factor 4		snake				
73	venom nerve growth factor 5		snake				
74	venom nerve growth factor		human				
75	beta-nerve growth factor		human				
76	beta-nerve growth factor		zebrafish				
77	neurotrophic factor-3		human				
78	neurotrophic factor-4/5		human				
79	neurotrophin-7		zebrafish				
Family 4							
	POGF-like		condensin sequence				
80	placental-derived growth factor A		human				
81	placental-derived growth factor B		human				
82	placental-derived growth factor C		human				
83	placental-derived growth factor D		human				
84	placenta growth factor		monkey				
85	POGF-related-vasculogenic protein-61a		snake				
86	Vascular Endothelial Growth Factor Usain		snake				
87	Vascular Endothelial Growth Factor Usain		human				
88	Vascular Endothelial Growth Factor A		human				
89	Vascular Endothelial Growth Factor B		human				
90	Vascular Endothelial Growth Factor C		human				
91	Vascular Endothelial Growth Factor D		human				
92	Vascular Endothelial Growth Factor homolog		orf-virus strain H22				
93	Vascular Endothelial Growth Factor homolog		orf-virus strain H21				
94	Vascular Endothelial Growth Factor A-A		subotrich				
95	vacc-like protein		orf-virus				
96	C-cis proto oncogene		owl				
Family 5							
	GM2-like		condensin sequence				
97	glycoprotein hormone alpha chain 1		salmon				

Figure 10.3

Accession	Description	Species	CDL	ADDDPSE	DEFPDQSE	YVSRHTLFRHNS	TLGSRFFTSQKELPIQ	NRPRDNRFTSKHLGIVQ	TCG	HGC	HSC
96	glycoprotein hormones alpha chain 2	salmon									
99	glycoprotein hormones alpha chain	human									
100	glycoprotein hormones alpha chain	macaque									
Family 4											
101	Reagin-Like	human									
102	Reagin-1	zebrafish									
103	Reagin-2	zebrafish									
104	Reagin-3	zebrafish									
105	Reagin-4	chicken									
106	Reagin-5	zebrafish									
107	Reagin-2	sponge									
108	Reagin-like protein 1	dugesia japonica									
109	Reagin-like protein 1	Flatworm									
Family 1											
110	Coagulin-like	no consensus sequence defined									
111	Coagulin (contains AB-chain + part-C)	honeybee									
112	Coagulin (contains AB-chain + part-C)	crab									
Family 2c/3											
113	ENTF-Like	fruit fly									
114	Burtonin	fruit fly									
115	Partene of burtonin	chicken									
116	protein GEP-18	human									
117	Corbevue	human									
118	Connective tissue growth factor	human									
119	DAG domain family member 5	human									
120	DAG domain family member 5	zebrafish									
121	Creelin-1	human									
122	Creelin-2	human									
123	Creelin-3	human									
124	Creelin-4	human									
125	Creelin-5	human									
126	Creelin-6	human									
127	Creelin-7	human									
128	Creelin-8	human									
129	Creelin-like protein c12orf88	human									
130	Creelin	human									
131	Slit homology 1 protein	human									
132	Slit homology 2 protein	human									
133	Slit homology 3 protein	human									
134	Protein slit	Drosophila									
135	sclerostin domain-containing protein 1	human									
136	sclerostin	human									
137	SOX-ependin	human									
138	von Hippel-Lindau factor	human									
139	Wnt-1-inducible signaling pathway protein 1	human									
140	Wnt-1-inducible signaling pathway protein 3	human									
141	Receptorin	Drosophila									
142	glycoprotein hormone alpha-2	human									
143	glycoprotein hormone alpha-2	macaque									
144	Protein jagged-1	human									
145	Protein jagged-2	human									

Figure 10.4

Seq No.	Seq	X4	X5	X6	CS	X7	CS	X8	CS
1	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
2	HWAGVQVLLGKLLGALALPFGVDFVQVFC				C	D			C
3	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	C			C
4	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	T			C
5	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	D			C
6	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	A			C
7	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	A			C
8	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
9	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
10	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
11	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
12	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
13	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
14	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
15	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
16	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
17	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
18	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
19	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
20	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
21	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
22	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
23	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
24	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
25	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
26	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
27	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
28	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
29	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
30	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
31	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
32	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
33	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
34	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
35	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
36	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
37	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
38	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
39	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
40	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
41	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
42	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
43	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
44	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
45	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
46	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
47	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
48	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
49	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
50	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C
51	HTVLAARVTRVATVQVAVLLEKSRVVFV				C	G			C

Figure 10.5

52	FRAGPAAHALLSLLVQDIDKAPATC	C	FRAGPAAHALLSLLVQDIDKAPATC	C	A	C	FRAGPAAHALLSLLVQDIDKAPATC	C	A	C	FRAGPAAHALLSLLVQDIDKAPATC
53	SPASVYQASGHSIMLILSHGARELLEVC	C	SPASVYQASGHSIMLILSHGARELLEVC	C	G	R	SPASVYQASGHSIMLILSHGARELLEVC	C	G	R	SPASVYQASGHSIMLILSHGARELLEVC
54	KVGLLEDTIRILNALLTQATPC	C	KVGLLEDTIRILNALLTQATPC	C	S	F	KVGLLEDTIRILNALLTQATPC	C	S	F	KVGLLEDTIRILNALLTQATPC
55	RRWPAQIYTHAIIGLLEHLEECVFFEC	C	RRWPAQIYTHAIIGLLEHLEECVFFEC	C	G	C	RRWPAQIYTHAIIGLLEHLEECVFFEC	C	G	C	RRWPAQIYTHAIIGLLEHLEECVFFEC
56	ASTPLAGASRIMHLOSIPWAFVC	C	ASTPLAGASRIMHLOSIPWAFVC	C	S	E	ASTPLAGASRIMHLOSIPWAFVC	C	S	E	ASTPLAGASRIMHLOSIPWAFVC
Family 2a/2 X (11)											
57	FRHIVKGVCPALPQV	C	FRHIVKGVCPALPQV	C	Q	C	FRHIVKGVCPALPQV	C	Q	C	FRHIVKGVCPALPQV
58	FRHIVKGVCPALPQV	C	FRHIVKGVCPALPQV	C	O	C	FRHIVKGVCPALPQV	C	O	C	FRHIVKGVCPALPQV
59	FRHIVKGVCPALPQV	C	FRHIVKGVCPALPQV	C	O	C	FRHIVKGVCPALPQV	C	O	C	FRHIVKGVCPALPQV
60	YVALVYKQVHRLQST	C	YVALVYKQVHRLQST	C	E	C	YVALVYKQVHRLQST	C	E	C	YVALVYKQVHRLQST
61	ETHEPILPFFICARAV	C	ETHEPILPFFICARAV	C	D	C	ETHEPILPFFICARAV	C	D	C	ETHEPILPFFICARAV
62	PTQSVKSLRSTPQA	C	PTQSVKSLRSTPQA	C	D	C	PTQSVKSLRSTPQA	C	D	C	PTQSVKSLRSTPQA
63	ITSDPSTKPLSYVQV	C	ITSDPSTKPLSYVQV	C	A	C	ITSDPSTKPLSYVQV	C	A	C	ITSDPSTKPLSYVQV
64	ITSDPSTKPLSYVQV	C	ITSDPSTKPLSYVQV	C	A	C	ITSDPSTKPLSYVQV	C	A	C	ITSDPSTKPLSYVQV
65	PTKAVLQAVLPLPQV	C	PTKAVLQAVLPLPQV	C	K	C	PTKAVLQAVLPLPQV	C	K	C	PTKAVLQAVLPLPQV
66	MTQINQVLPKSHALQVQ	C	MTQINQVLPKSHALQVQ	C	E	C	MTQINQVLPKSHALQVQ	C	E	C	MTQINQVLPKSHALQVQ
67	STIEEHCSTFRVQVQV	C	STIEEHCSTFRVQVQV	C	E	C	STIEEHCSTFRVQVQV	C	E	C	STIEEHCSTFRVQVQV
Family 3											
68	AGIDKRNKQ	C	AGIDKRNKQ	C	Y	C	AGIDKRNKQ	C	Y	C	AGIDKRNKQ
69	AGIDKRNKQ	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ
70	AGIDKRNKQ	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ
71	AGIDKRNKQ	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ
72	AGIDKRNKQ	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ
73	AGIDKRNKQ	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ
74	AGIDKRNKQ	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ
75	AGIDKRNKQ	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ
76	AGIDKRNKQ	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ
77	AGIDKRNKQ	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ
78	AGIDKRNKQ	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ
79	AGIDKRNKQ	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ	C	V	C	AGIDKRNKQ
Family 4											
80	ITREK	C	ITREK	C	A	C	ITREK	C	A	C	ITREK
81	ITREK	C	ITREK	C	K	C	ITREK	C	K	C	ITREK
82	ACCLMNCQ	C	ACCLMNCQ	C	D	C	ACCLMNCQ	C	D	C	ACCLMNCQ
83	GCCTVRSCT	C	GCCTVRSCT	C	E	C	GCCTVRSCT	C	E	C	GCCTVRSCT
84	QIENR	C	QIENR	C	C	C	QIENR	C	C	C	QIENR
85	QIENR	C	QIENR	C	C	C	QIENR	C	C	C	QIENR
86	TQELK	C	TQELK	C	E	C	TQELK	C	E	C	TQELK
87	TQELK	C	TQELK	C	E	C	TQELK	C	E	C	TQELK
88	RUGLE	C	RUGLE	C	C	C	RUGLE	C	C	C	RUGLE
89	FQDGL	C	FQDGL	C	E	C	FQDGL	C	E	C	FQDGL
90	QICQL	C	QICQL	C	D	C	QICQL	C	D	C	QICQL
91	QICQL	C	QICQL	C	D	C	QICQL	C	D	C	QICQL
92	QICQL	C	QICQL	C	D	C	QICQL	C	D	C	QICQL
93	QICQL	C	QICQL	C	D	C	QICQL	C	D	C	QICQL
94	QICQL	C	QICQL	C	D	C	QICQL	C	D	C	QICQL
95	QICQL	C	QICQL	C	D	C	QICQL	C	D	C	QICQL
96	QICQL	C	QICQL	C	D	C	QICQL	C	D	C	QICQL
Family 5											
97	ITVLSIQIATVPTD	C	ITVLSIQIATVPTD	C	N	C	ITVLSIQIATVPTD	C	N	C	ITVLSIQIATVPTD
	ITVLSIQIATVPTD	C	ITVLSIQIATVPTD	C	N	C	ITVLSIQIATVPTD	C	N	C	ITVLSIQIATVPTD

Figure 10.6

90	ESRATVTHLSSGDLVPSHITSKATC	G	VAREGIVTTGGDFVYVNRIS	C	H	C	STCYVRS
91	ESRATVTHLSSKATLVQSVVTSKTC	C	VMSIVKVVTHGDFVYVNRIS	C	H	C	STCYVRS
100	ESRATVTHLSSKATLVQSVVTSKTC	C	VMSIVKVVTHGDFVYVNRIS	C	H	C	STCYVRS
Family 6							
101	SVPYKDY	C	KPSKSNLVLEKRCDFGQKSHFLOVPLISE	C	K	C	GC
102	SVPYKDY	C	RPANRHTITLMMKVRGQALGAMIPVYVITE	C	K	C	SCAM
103	SVPYKDY	C	RPVAVTITLAMPCCDPPQKRTVMSVQVPIID	C	K	C	GC
104	SVPYKDY	C	RPVSRVLTLLAMCYVQSGQKQKQVQVYVISE	C	K	C	SCDA
105	SNPZYHA	C	RPVQLALALLAMKMAKIVGDFGKIMQVYVYVA	C	X	C	SCN
106	SLVYKDF	C	RPVQVYVTLAMKQKDSFALKKCMYVYVISO	C	A	C	AC
107	SIPRAAEI	C	RPVTRDQCHFTALAMQCSVYVETIYRQVINGKREKLSRQVICKRQVNLNPLIACD	C	D	C	ACTQVHRYM1
108	SNPFCHEI	C	RPVTRDQCHFTALAMQCSVYVETIYRQVINGKREKLSRQVICKRQVNLNPLIACD	C	D	C	SCQK
109	SNPFCHEI	C	RPVTRDQCHFTALAMQCSVYVETIYRQVINGKREKLSRQVICKRQVNLNPLIACD	C	T	C	GC
Family 7							
110	QMRCA	C	TDGSRVPLVTVLAKNDFVFEQVINTCCG	C	F	C	R5
111	QMSR	C	TDGSRVPLVTVLAKNDFVFEQVINTCCG	C	F	C	RIV
Family 2e/8							
112	RSYGVGKNTKMERKIC	C	XXXXXXXXXXKXKX [GRI]XKXKXKXZAKX	C	X	C	(X)hc (n-2-4)
113	RSYGVGKNTKMERKIC	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	M	C	RECTSFEKIG
114	VGRIC	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	R	C	FRQKQVTA
115	GSVHTGADSNITGSH	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	A	C	KVQCFRQKZA
116	TGRIC	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	D	C	IVATKQKQK
117	VGRIC	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	A	C	IVATKQKQK
118	SALYIYKDKTFLVGRIC	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	R	C	IVATKQKQK
119	HFTVYCFAGLQKFTS	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	E	C	SEVA
120	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	A	C	LSIDL
121	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	S	C	NSVPLD
122	STYVYVMDQALQKIC	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	Q	C	LSIDL
123	QSSKRTSLQRTYKIC	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
124	PCASRYKSNQWQKQTC	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	Q	C	LSIDL
125	LSALSTLQYQKQKIC	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
126	EDKIC	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	V	C	LSIDL
127	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	H	C	LSIDL
128	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	T	C	LSIDL
129	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	A	C	LSIDL
130	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
131	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
132	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
133	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
134	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
135	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
136	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
137	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
138	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
139	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
140	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
141	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
142	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
143	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	G	C	LSIDL
144	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	L	C	LSIDL
145	RSYVTRKTRKSHVFCDF	C	RSYGVGKNTKMERKIC	C	K	C	LSIDL

Figura 11

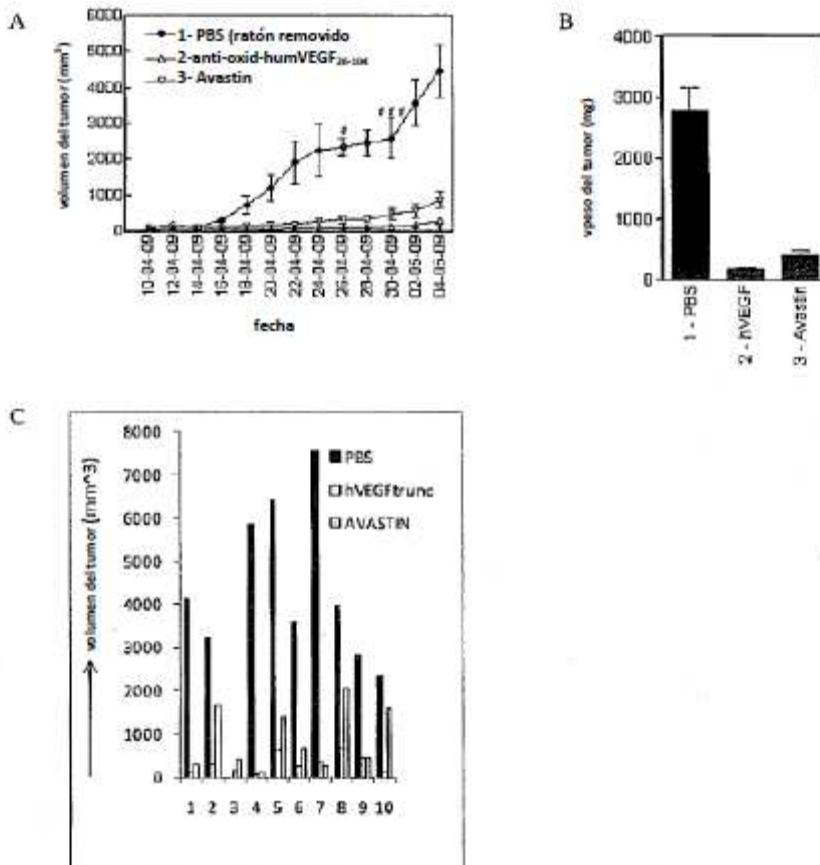
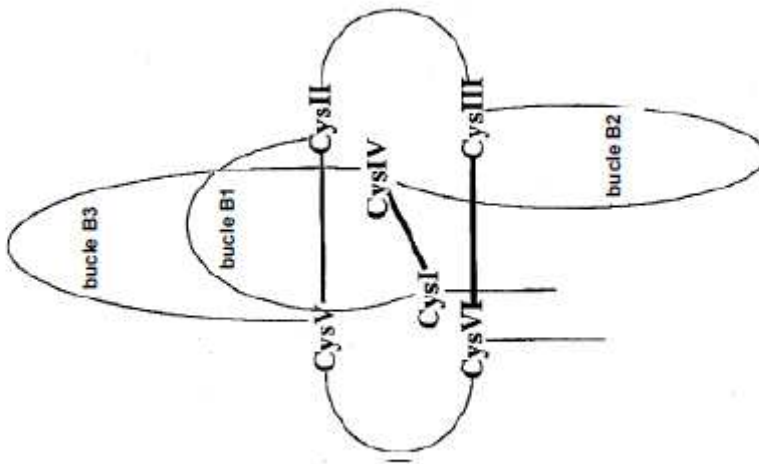


Figura 12

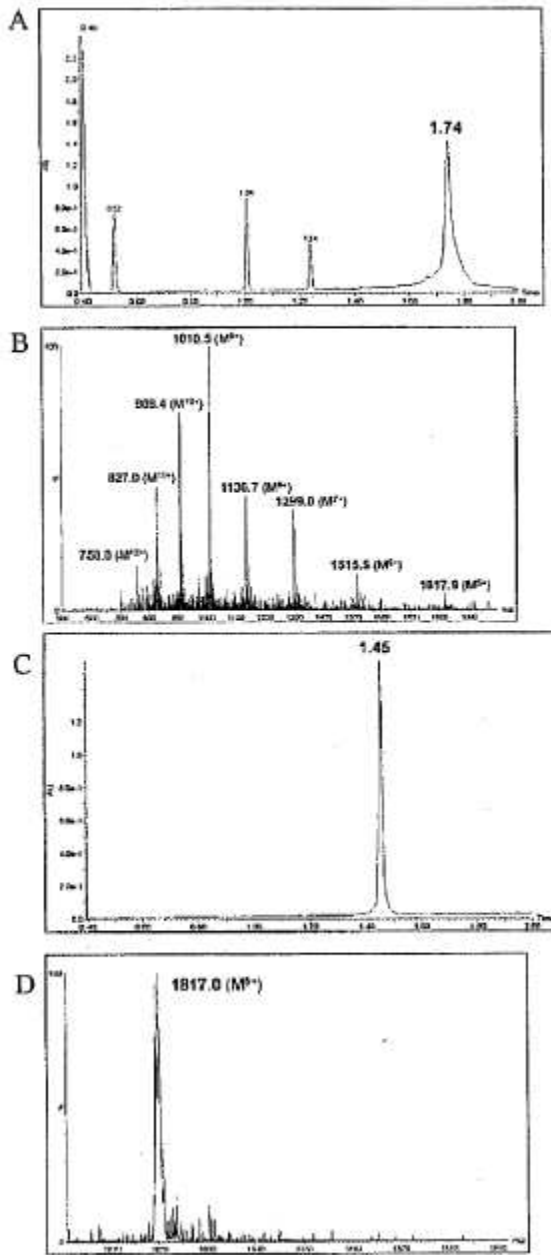
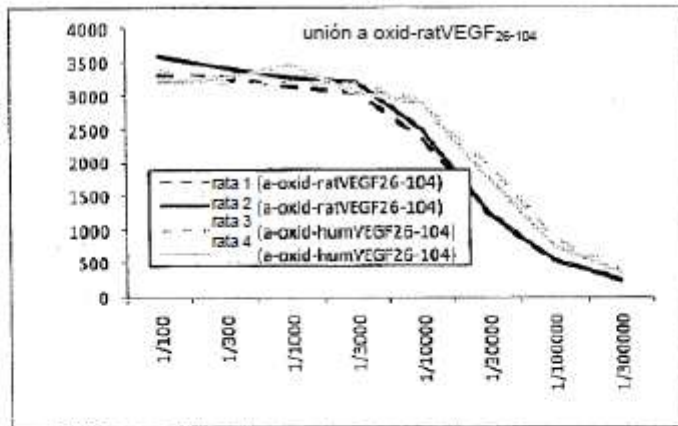


Figura 13

A



B

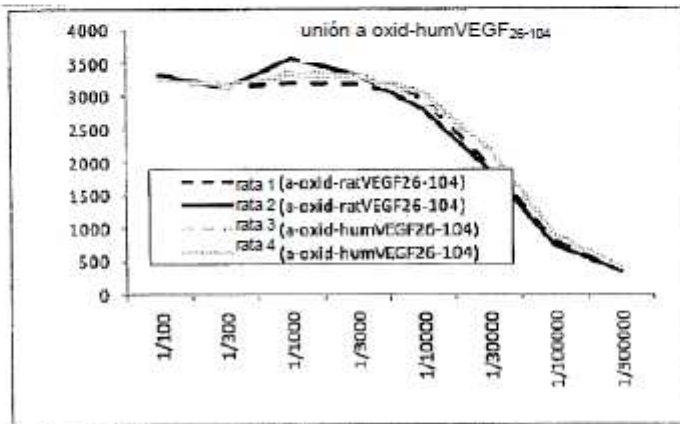


Figura 14

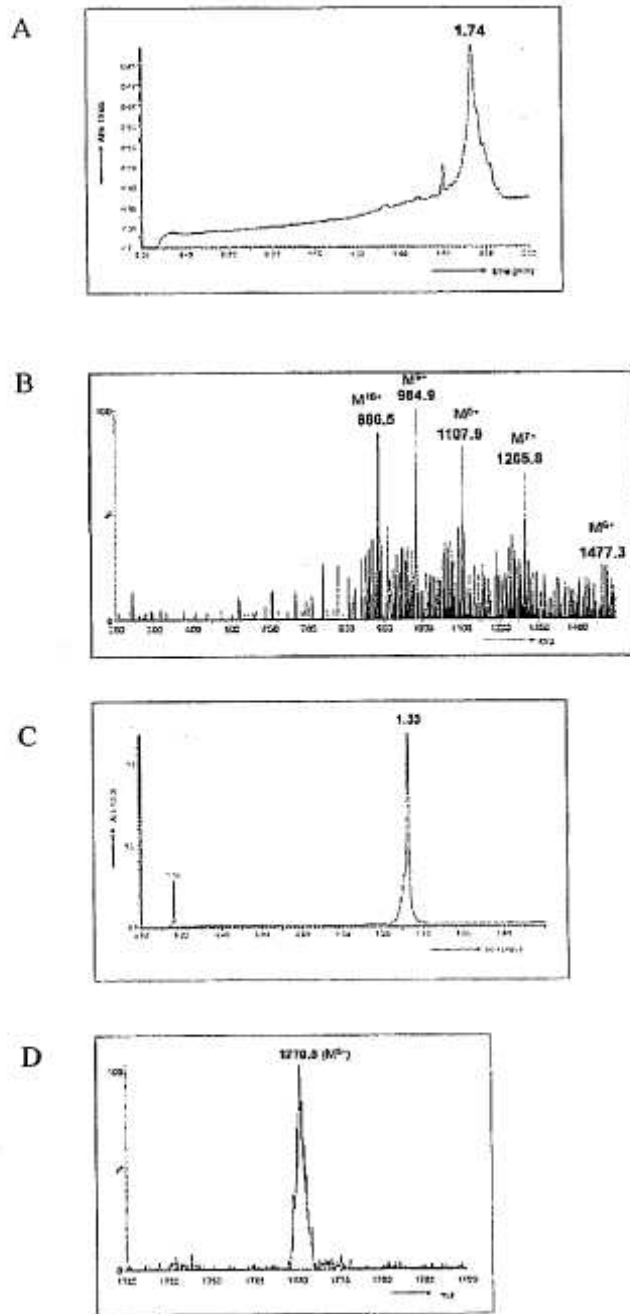


Figura 15

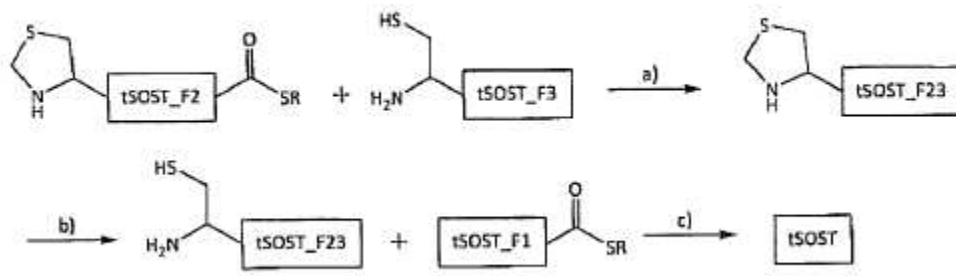


Figura 16

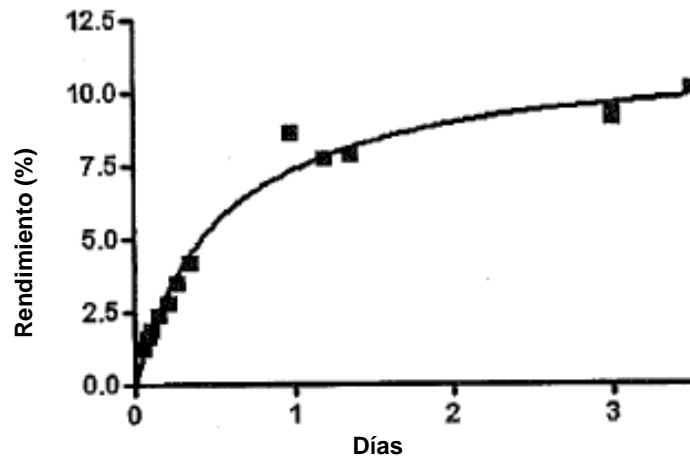


Figura 17

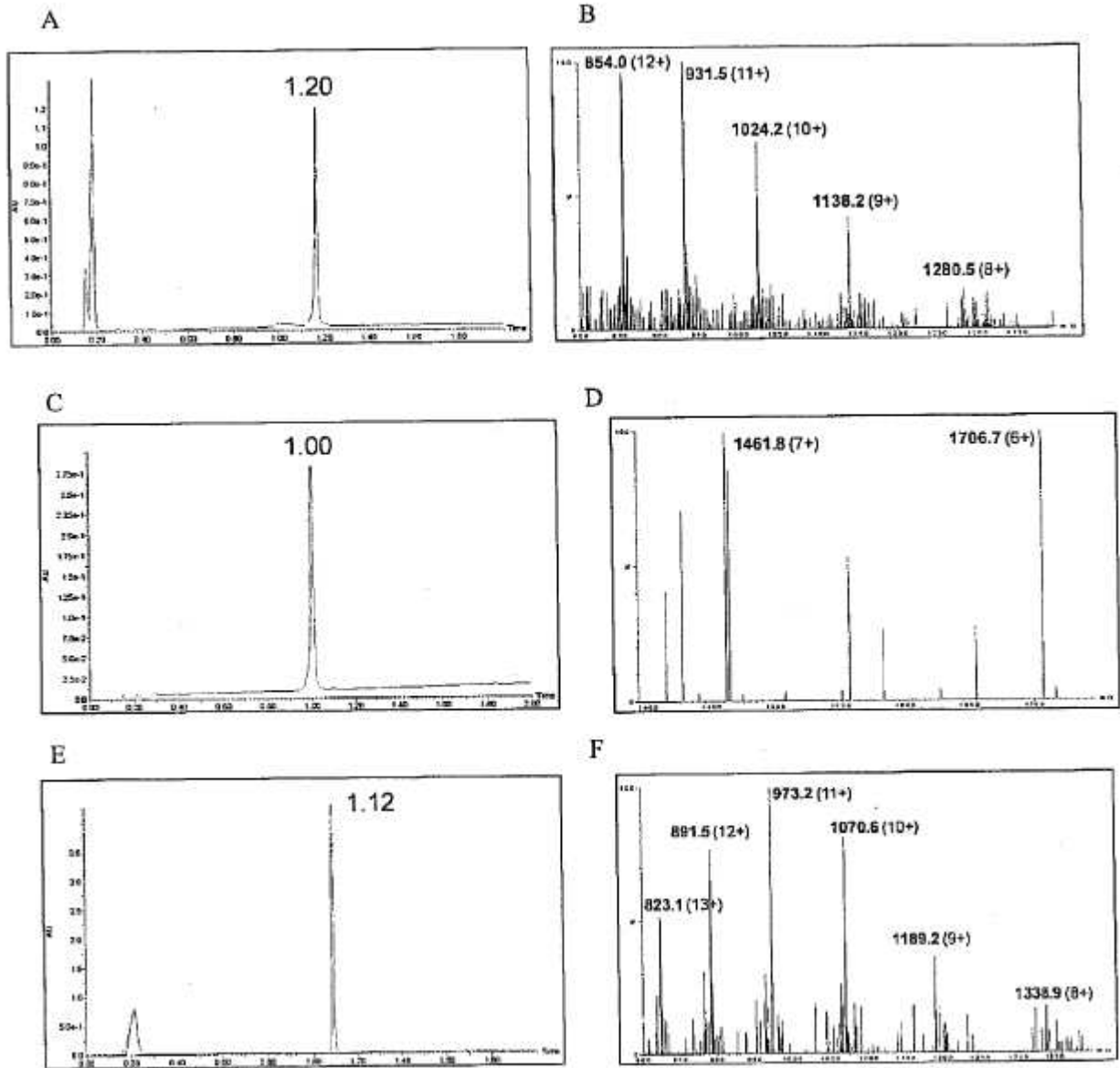


Figura 18

Señal (x-fold) sobre fondo

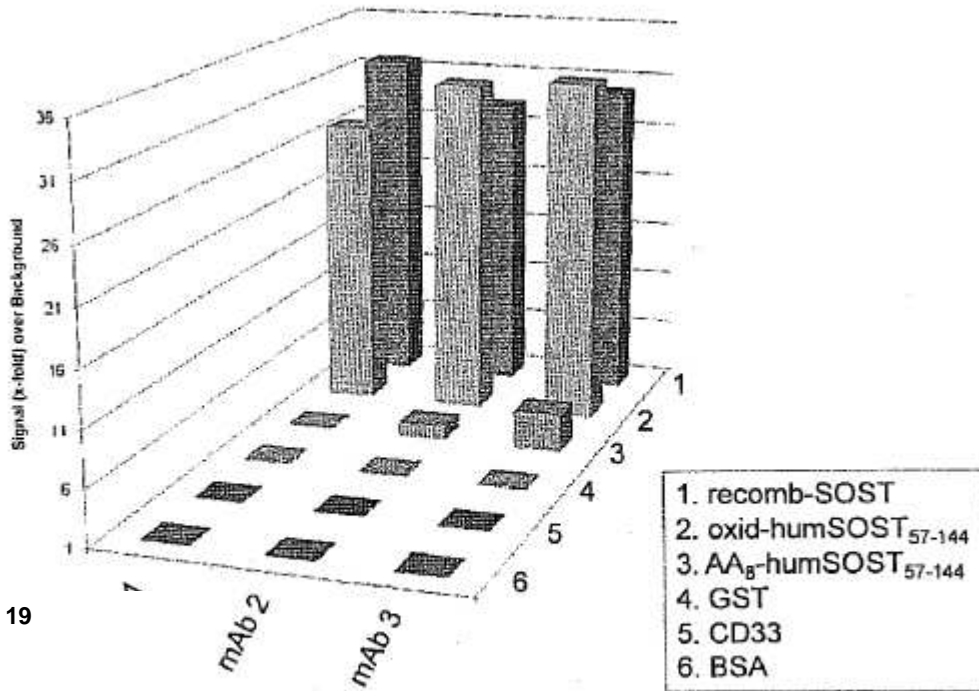


Figura 19

Figure 19

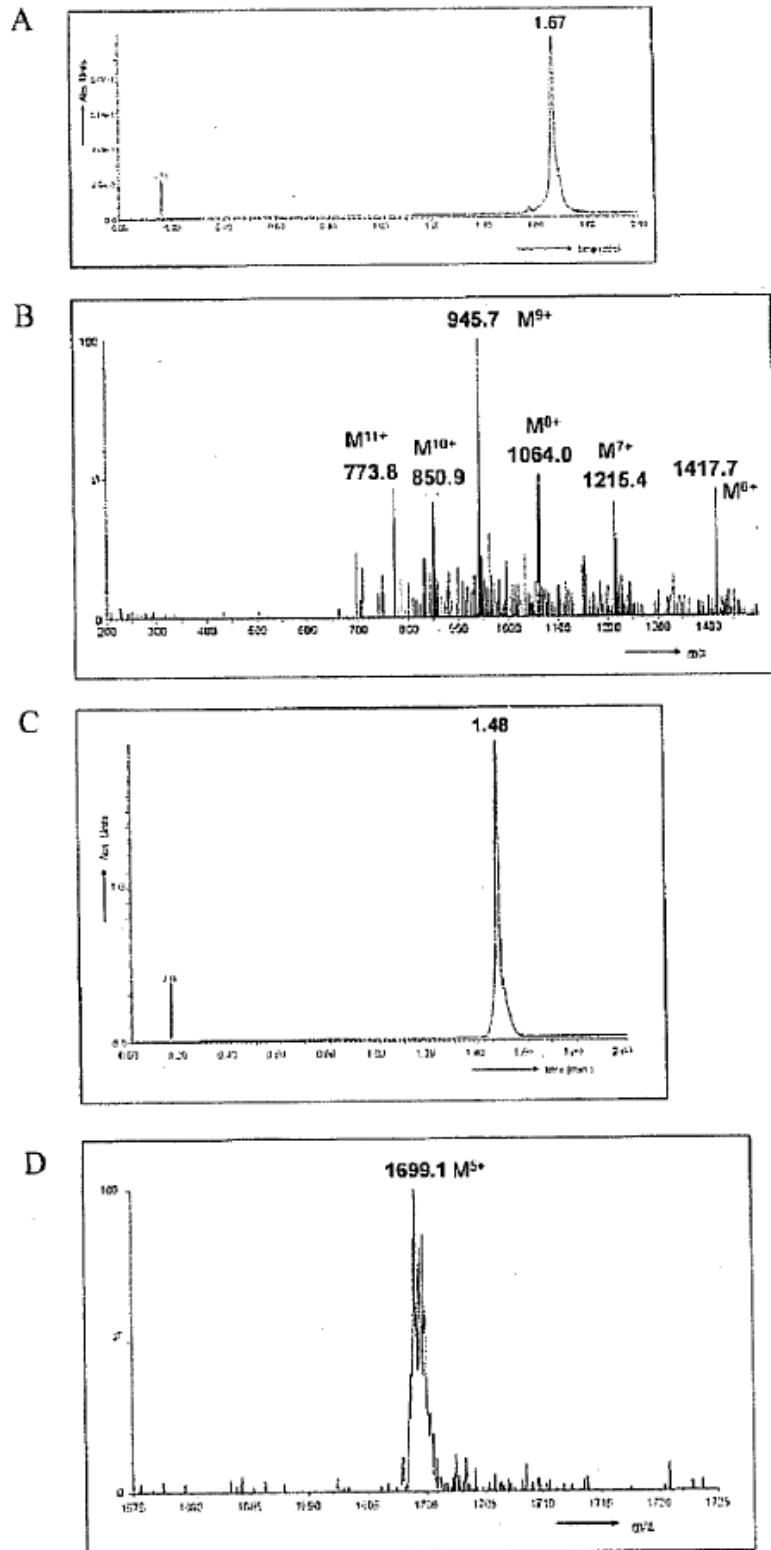


Figura 20

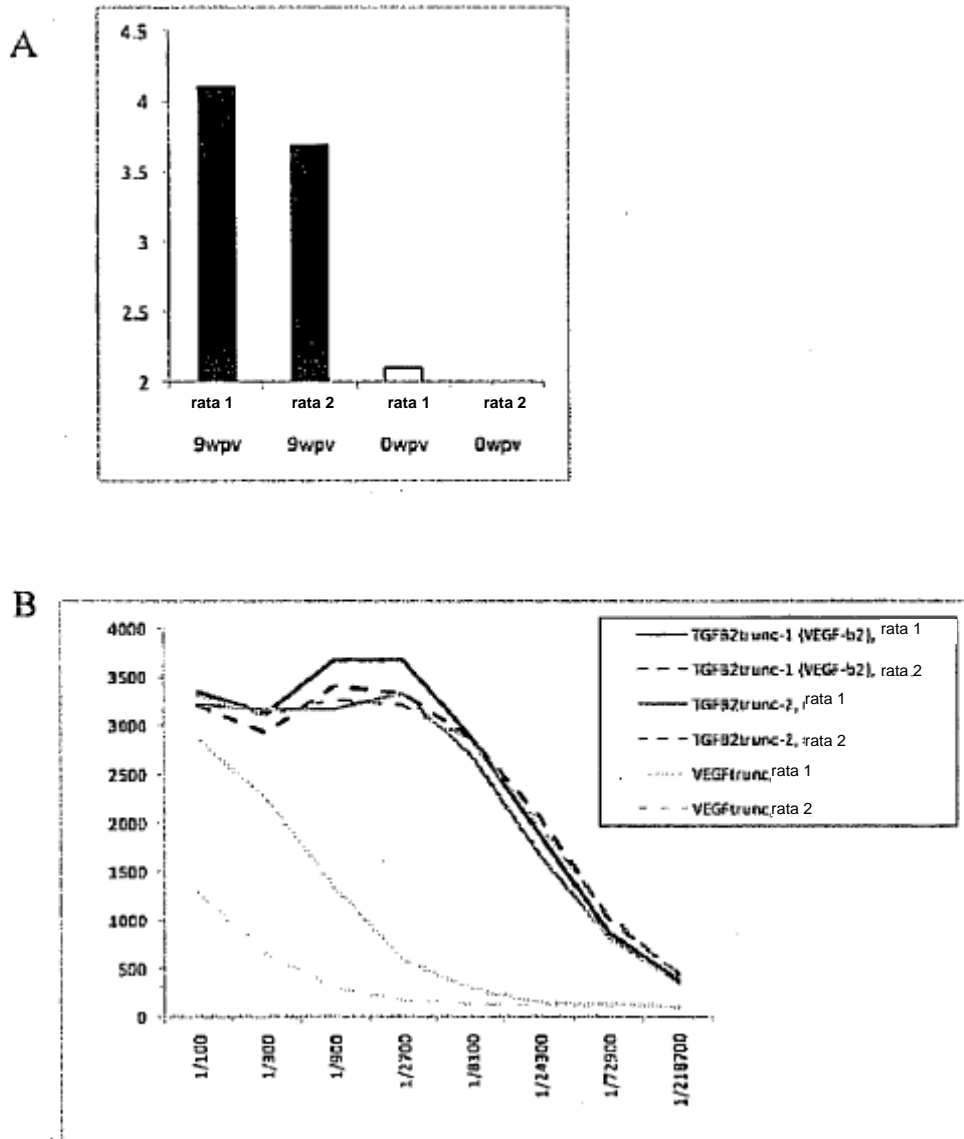


Figura 21