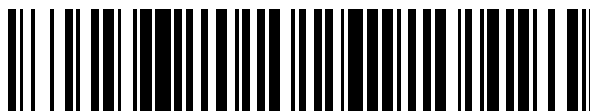


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 018**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/495 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2008 E 08863207 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2262540**

54 Título: **Construcción de una proteína asociada a la latencia que contenga un sitio de escisión sensible a la agrecanasa**

30 Prioridad:

17.12.2007 GB 0724556

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

25.11.2015

73 Titular/es:

**STEALTHYX THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
Queens Building Room E204, Mile End Road
London E1 4NS, GB**

72 Inventor/es:

**CHERNAJOVSKY, YUTI y
ADAMS, GILLIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 552 018 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

Construcción de una proteína asociada a la latencia que contenga un sitio de escisión sensible a la agrecanasa

- 5 [0001] La presente invención se refiere a proteínas de fusión y constructos de ácido nucleico que confieren latencia a principios farmacéuticamente activos donde el principio farmacéuticamente activo se libera por la acción de una agrecanasa. Dichos productos son útiles en el tratamiento de la artritis y el cáncer.
- 10 [0002] La mayoría de las citocinas y los factores de crecimiento se expresan bajo mecanismos de control estrictos. Su expresión génica está regulada por estímulos ambientales como las infecciones, las interacciones célula-célula, el cambio en la composición de la matriz extracelular y las interacciones con las moléculas de adhesión o mediante la estimulación con otras citocinas.
- 15 [0003] Además del control a nivel transcripcional y postranscripcional, algunas citocinas no se liberan en el medio a menos que una segunda señal active la célula. Un tercer nivel de regulación de la actividad de las citocinas se encuentra en moléculas que son secretadas en forma latente y son "activadas" mediante liberación de la porción de citocina en donde tienen lugar procesos de inflamación, cicatrización de heridas y reparación de tejidos (Khalil N, *Microbes and Infection*, 1, 1255-1263 (1999). Con respecto a esto último, el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) ha recibido gran atención.
- 20 [0004] TGF β se sintetiza como una citocina latente dimérica compuesta de una proteína amino terminal asociada a la latencia (LAP) y la citocina TGF β activa en su extremo terminal COOH (Roberts y Sporn, *Peptide Growth Factors and their Receptors*: Sporn, MB y Roberts, AB, Springer-Verlag, 419-472 (1996); Roth-Eicchorn et al., *Hepatology*, 28 1588-1596 (1998)). El péptido precursor contiene un péptido señal (residuos 1-29) necesario para la secreción de la proteína y para guiar a la molécula a través del aparato de Golgi a fin de ser procesada por escisión proteolítica y glucosilación. El dominio de LAP se separa de TGF β por escisión proteolítica en las argininas (277-278). TGF β maduro comienza en la alanina 279. LAP, además de proteger a TGF β , contiene residuos importantes necesarios para la interacción con otras moléculas. Las mutaciones en el dominio de LAP se han asociado recientemente a la enfermedad autosómica dominante de Camurati-Engelmann (Janssens et al., *Nature Genetics*, 26, 273-275 (2000).
- 25 [0004] Las cisteínas 224 y 226 son importantes en el enlace disulfuro intermolecular entre dos LAP. Su mutación a serina transforma la molécula en "activa" (Sanderson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 2572-2576 (1995); Brunner et al., *Mol. Endocrinol.* 6, 1691-1700 (1992); Brunner et al., *J. Biol. Chem.* 264, 13660-13664 (1989)). El motivo RGD (245-247) facilita la interacción con integrinas (Munger et al., *Mol. Biol. of the Cell*, 9, 2627-2638 (1998); Derynck R, *TIBS*, 19, 548-553 (1994)). El ácido nucleico que codifica a TGF β se describe en US 5801231.
- 30 [0005] En la mayoría de los tipos de células estudiados, que incluyen los de origen mesenquimático, epitelial y endotelial, TGF β se secreta en una forma latente que consta de TGF β y sus dímeros del propéptido del péptido asociado a la latencia (LAP), unidos covalentemente a proteínas de unión a TGF β latente (LTBP). Las LTBP también son necesarias para la secreción y el plegamiento de TGF β (Miyazano et al., *EMBO J.* 10, 1091-1101 (1991); Miyazano et al., *J. Biol. Chem.* 267, 5668-5675 (1992); Eklov et al., *Cancer Res.* 53, 3193-3197 (1993)). La cisteína 33 es importante para el puente disulfuro con la tercera repetición rica en 8 cisteínas de la proteína de unión a TGF β latente (LTBP) (Saharinen et al., *The EMBO Journal*, 15, 245-253 (1996). La modificación de LTBP por enzimas como la trombospondina (Schultz et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 26783-26788 (1994); Crawford et al., *Cell*, 93, 1159-1170 (1998)), la transglutaminasa (Nunes et al., *J. Cell. Biol.* 136, 1151-1163 (1997); Kojima et al., *The Journal of Cell Biology*, 121,439-448 (1993)) y MMP9, MMP2 (Yu y Stamenkovic, *Genes and Dev.* 14, 163-176 (2000)) podría liberar la porción activa de TGF β del complejo latente.
- 35 [0006] Las citocinas son productos naturales que sirven como mediadores locales solubles de las interacciones célula-célula. Tienen una variedad de acciones pleiotrópicas, algunas de las cuales se pueden aprovechar con fines terapéuticos. La administración dirigida de citocinas a tipos celulares específicos empleando scFv (Lode et al., *Pharmacol. Ther.* 80, 277-292 (1998)) y vWF (Gordon et al., *Human Gene Therapy*, 8, 1385-1394 (1997)) se ha centrado exclusivamente en la porción activa de la citocina del complejo de citocina.
- 40 [0007] Las proteínas farmacológicamente activas u otros medicamentos a base de dichos agentes, que deben ser administrados sistémicamente en concentraciones muy altas para lograr concentraciones biológicamente eficaces en el tejido al que son dirigidos, tienden a producir efectos sistémicos indeseables, por ejemplo toxicidad, que limitan su uso y eficacia.
- 45 [0008] Los principios subyacentes a la construcción de un sistema de ese tipo para proporcionar latencia a principios farmacéuticamente activos usando el LAP de TGF- β se describieron en WO 02/055098. Los inventores de la presente han desarrollado en la actualidad una mejor manera para proporcionar principios farmacéuticamente activos en forma latente basándose en este sistema.
- 50 [0009] Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una proteína de fusión que comprende un péptido

asociado a la latencia (LAP) que es el dominio precursor de TGF β -1, -2, -3, -4 o -5 y un principio farmacéuticamente activo en la que el LAP y el principio farmacéuticamente activo están unidos por una secuencia de aminoácidos que comprende un sitio de escisión proteolítica por una agrecanasa escindido por ADAMTS-4 (agrecanasa-1) o ADAMTS-5 (agrecanasa-2).

5

[0010] La proteína de fusión que contiene un LAP, un sitio de escisión proteolítica por una agrecanasa y un principio farmacéuticamente activo puede proporcionar la activación específica del sitio del principio farmacéuticamente activo latente. La expresión "activación específica del sitio" según se usa en este documento significa, en términos generales y no exclusivamente, la eliminación o la reducción de la latencia, conferida a un principio farmacéuticamente activo, mediante escisión específica del sitio, en el sitio de escisión proteolítica por una agrecanasa.

10

[0011] Se espera que la escisión específica del sitio en el sitio de escisión proteolítica tenga lugar concomitantemente con la activación restaurada del principio farmacéuticamente activo.

15

[0012] La expresión "principio farmacéuticamente activo latente" según se usa en este documento puede incluir, pero no exclusivamente, principios farmacéuticamente activos que son latentes debido a su asociación con el LAP y un sitio de escisión proteolítica por una agrecanasa. Específicamente, el principio farmacéuticamente activo puede ser latente en virtud de su fusión a un sitio de escisión proteolítica por una agrecanasa asociado a LAP para formar una proteína de fusión latente.

20

[0013] El término "proteína" en este texto, significa en términos generales, una pluralidad de residuos de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Se usa indistintamente y significa lo mismo que péptido, oligopéptido, oligómero o polipéptido, e incluye glucoproteínas y sus derivados. El término "proteína" también pretende incluir fragmentos, análogos y derivados de una proteína en la que el fragmento, el análogo o el derivado mantiene esencialmente la misma actividad biológica o función que la proteína de referencia.

25

[0014] El fragmento, análogo o derivado de la proteína según se define en este texto, puede tener al menos 6, preferentemente 10 o 20, o hasta 50 o 100 aminoácidos de longitud.

30

[0015] El fragmento, derivado o análogo de la proteína puede ser (i) uno en el cual uno o más de los residuos de aminoácidos son sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente, un residuo de aminoácido conservado) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede o no ser codificado por el código genético, o (ii) uno en el cual uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, o (iii) uno en el cual el polipéptido maduro está fusionado a otro compuesto, como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) uno en el cual los aminoácidos adicionales se fusionan al polipéptido maduro, como una secuencia líder o secretora que se emplea para la purificación del polipéptido. Se considera que dichos fragmentos, derivados y análogos se encuentran dentro del área de competencia de los expertos a partir de las enseñanzas de este documento.

35

40

[0016] Se prefieren particularmente las variantes, los análogos, derivados y fragmentos que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína en la cual varios, por ejemplo, 5 a 10, o 1 a 5, o 1 a 3, 2, 1 residuos de aminoácidos o ningún residuo de aminoácido están sustituidos, eliminados o añadidos en ninguna combinación. Se prefieren especialmente entre éstas las sustituciones, adiciones y eliminaciones silenciosas, que no alteran las propiedades ni las actividades de la proteína de la presente invención. A este respecto también se prefieren especialmente las sustituciones conservadoras.

45

[0017] Un ejemplo de una variante es una proteína de fusión como la definida antes, aparte de la sustitución de uno o más aminoácidos con uno o más de otros aminoácidos. El experto es consciente de que varios aminoácidos tienen propiedades similares. Uno o más de dichos aminoácidos de una sustancia puede a menudo ser sustituido por uno o más de otros aminoácidos de ese tipo sin eliminar una actividad deseada de esa sustancia.

50

[0018] Por lo tanto, los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina pueden a menudo ser sustituidos unos por los otros (aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas). De estas posibles sustituciones se prefiere que glicina y alanina se usen para sustituirse entre sí (puesto que tienen cadenas laterales relativamente cortas) y que valina, leucina e isoleucina se usen para sustituirse entre sí (ya que tienen grandes cadenas laterales alifáticas que son hidrófobas). Otros aminoácidos que a menudo se pueden sustituir entre sí son: fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos con cadenas laterales aromáticas); lisina, arginina e histidina (aminoácidos con cadenas laterales básicas); aspartato y glutamato (aminoácidos con cadenas laterales ácidas); asparragina y glutamina (aminoácidos con cadenas laterales amida); y cisteína y metionina (aminoácidos con cadenas laterales que contienen azufre).

55

60

[0019] Las sustituciones de esta naturaleza se denominan a menudo sustituciones de aminoácidos "conservadoras"

o "semiconservadoras".

[0020] Las eliminaciones a inserciones de aminoácidos también se pueden hacer en relación con la secuencia de aminoácidos para la proteína de fusión mencionada. Así, por ejemplo, los aminoácidos que no tienen un efecto sustancial sobre la actividad del polipéptido, o al menos que no eliminan dicha actividad, pueden ser eliminados. Dichas eliminaciones pueden ser ventajosas puesto que la longitud total y el peso molecular de un polipéptido se pueden reducir manteniendo simultáneamente la actividad. Esto puede permitir reducir la cantidad de polipéptido necesaria para un propósito particular, por ejemplo, se pueden reducir los niveles de dosificación.

[0021] También se pueden hacer inserciones de aminoácidos en relación con la secuencia de la proteína de fusión mencionada antes. Esto se puede hacer para alterar las propiedades de una sustancia de la presente invención (por ej. para ayudar a la identificación, purificación o expresión, como se explicó antes en relación con las proteínas de fusión).

[0022] Los cambios de aminoácidos en relación con la secuencia para la proteína de fusión de la invención se pueden hacer usando cualquier técnica adecuada, por ej., empleando mutagénesis sitio-dirigida.

[0023] Se debe entender que las sustituciones o inserciones de aminoácidos se pueden hacer empleando aminoácidos de origen natural o no natural. Ya sea que se empleen aminoácidos naturales o sintéticos, es preferible que sólo estén presentes los L-aminoácidos.

[0024] Una proteína según la invención puede tener secuencias de aminoácidos N-terminales y/o C-terminales adicionales. Tales secuencias se pueden proporcionar por varias razones, por ejemplo, glucosilación.

[0025] La expresión "proteína de fusión" en este texto, significa en términos generales, una o más proteínas unidas por medios químicos, que incluyen enlaces de hidrógeno o puentes salinos, o mediante enlaces peptídicos a través de síntesis de proteínas, o ambos.

[0026] El péptido asociado a la latencia (LAP) de la presente invención es el dominio precursor de TGFβ-1, -2, -3, -4 o -5 o una secuencia que sea sustancialmente idéntica a éste.

[0027] "Identidad" como se conoce en el área es la relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada mediante comparación de las secuencias. En el área, identidad también significa el grado de relación de la secuencia (homología) entre secuencias de polipéptidos o de polinucleótidos, según sea el caso, determinado por la correspondencia entre series de dichas secuencias. Si bien existen una serie de métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polipéptidos o dos secuencias de polinucleótidos, los métodos empleados comúnmente para determinar la identidad son codificados en programas informáticos. Los programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no exclusivamente, el paquete de programas GCG (Devereux, et al., Nucleic acids Research, 12, 387 (1984), BLASTP, BLASTN y FASTA (Atschul et al., J. Molec. Biol. 215, 403 (1990)).

[0028] El LAP de la presente invención consiste en el dominio precursor de TGFβ-1, -2, -3, -4 o -5, por ejemplo, el péptido precursor de TGFβ-1, 2 o 3 (de humano) (Derynck et al., Nature, 316, 701-705 (1985); De Martin et al., EMBO J. 6 3673-3677 (1987); Hanks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 79-82 (1988); Derynck et al., EMBO J. 7, 3737-3743 (1988); Ten Dyke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4715-4719 (1988)) TGFβ-4 (de pollo) (Jakowlew et al., Mol. Endocrinol. 2, 1186-1195 (1988)) o TGFβ-5 (de xenopus) (Kondaiah et al., J. Biol. Chem. 265, 1089-1093 (1990)). La expresión "dominio precursor" se define como una secuencia que codifica un péptido precursor que no incluye la secuencia que codifica la proteína madura. Las secuencias de aminoácidos del dominio precursor de TGFβ 1, 2, 3, 4 y 5 (Roberts y Sporn, Peptide Growth Factors and their Receptors: Sporn, MB y Roberts, AB, Springer-Verlag, capítulo 8, 422 (1996)) se muestran en la figura 1.

[0029] Preferentemente, la secuencia de aminoácidos del LAP tiene al menos 50% de identidad, utilizando los parámetros predefinidos del programa informático BLAST (Atschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)) provisto por HGMP (Human Genome Mapping Project), a nivel de aminoácido, con el dominio precursor de TGFβ 1, 2, 3, 4 o 5 (Roberts y Sporn, Peptide Growth Factors and their Receptors: Sporn, MB y Roberts, AB, Springer-Verlag, capítulo 8, 422 (1996)) como se muestra en la figura 1. Más preferentemente, el LAP puede tener al menos 60%, 70%, 80%, 90% y aún más preferentemente 95% (todavía más preferentemente al menos 99%) de identidad, a nivel de ácido nucleico o aminoácido, con el dominio precursor de TGFβ 1, 2, 3, 4 o 5 como se muestra en la figura 1 que comprende los residuos 1 a 278.

[0030] El LAP comprende el LAP de TGFβ 1, 2, 3, 4 o 5 (Roberts y Sporn, Peptide Growth Factors and their Receptors: Sporn, MB y Roberts, AB, Springer-Verlag, capítulo 8, 422 (1996)) como se muestra la figura 1.

[0031] El LAP puede contener por lo menos dos, por ejemplo aAl menos 4, 6, 8, 10 o 20 residuos de cisteína para la formación de enlaces disulfuro.

[0032] El LAP puede proporcionar una "cáscara protectora" alrededor del principio farmacéuticamente activo blindándolo de ese modo y obstaculizando, o impidiendo, su interacción con otras moléculas de la superficie celular o moléculas importantes para su actividad.

[0033] El LAP también puede contener una secuencia que tenga al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de identidad con la secuencia del LAP de la figura 1, usando los parámetros predefinidos del programa informático BLAST provisto por HGMP, a esos efectos.

[0034] El sitio de escisión proteolítica consiste en un sitio de escisión por una agrecanasa específico que es escindible por ADAMTS-4 (agrecanasa-1) o ADAMTS-5 (agrecanasa-2). Un sitio de escisión por una agrecanasa puede comprender una cantidad de residuos de aminoácidos reconocibles por una agrecanasa. Además, los aminoácidos del sitio de escisión sensible a una agrecanasa pueden estar unidos por uno o más enlaces peptídicos que son escindibles, proteolíticamente, por una agrecanasa.

[0035] Las agrecanasas que pueden escindir el sitio de escisión sensible a una agrecanasa comprenden ADAMTS-4 (agrecanasa-1) o ADAMTS-5 (agrecanasa-2) (Tortorella, M.D., et al Osteoarthritis Cartilage, 2001. 9(6): p. 539-552); Abbaszade, I., et al J Biol Chem, 1999. 274(33): p. 23443-23450).

[0036] Las secuencias de los sitios de escisión de la proteína de ADAMTS-4 (agrecanasa-1) se muestran en la figura 2. Los sitios para ADAMTS-4 adecuados incluyen:

HNEFRQRETYMVF

DVQEFRGVTAVIR

[0037] El motivo de escisión de ADAMTS-4 de consenso puede ser representado según Hills et al (J. Biol. Chem. 282 11101-11109 (2007)) como:

E-[AFVLMY]-X_(0,1)-[RK]-X_(2,3)-[ST]-[VYIFWMLA]

[0038] Preferentemente, el sitio de escisión proteolítica por una agrecanasa de la presente invención se escinde en los sitios de una enfermedad diagnosticada como artritis o cáncer que se caracterizan por inflamación y/o remodelación del tejido. El sitio de escisión proteolítica por una agrecanasa de la presente invención es escindido por ADAMTS-4 (agrecanasa-1) o ADAMTS-5 (agrecanasa-2).

[0039] La secuencia de aminoácidos del sitio de escisión por una agrecanasa incluye una secuencia que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de identidad, empleando los parámetros predefinidos del programa informático BLAST provisto por HGMP, a esos efectos. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico que codifica el sitio de escisión por una agrecanasa contiene el número mínimo de residuos necesarios para el reconocimiento y la escisión por una agrecanasa.

[0040] La presente invención puede proporcionar además un péptido "conector". Preferentemente el péptido conector está unido a una secuencia de aminoácidos del sitio de escisión proteolítica. El péptido conector se puede proporcionar en el extremo C-terminal o N-terminal de la secuencia de aminoácidos que codifica el sitio de escisión proteolítica. Preferentemente, el péptido conector es continuo con la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión proteolítica. El péptido conector puede contener la secuencia de aminoácidos GGGGS o un múltiplo de ésta (por ejemplo un dímero, un trímero o un tetramero), un conector adecuado puede ser (GGGGS)₃, o una secuencia de nucleótidos que tenga al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de identidad, empleando los parámetros predefinidos del programa informático BLAST provisto por HGMP, a esos efectos.

[0041] La expresión "péptido conector" pretende definir cualquier secuencia de residuos de aminoácidos que proporcione preferentemente una región hidrófila cuando está contenida en una proteína expresada. Dicha región hidrófila puede facilitar la escisión por una enzima en el sitio de escisión proteolítica.

[0042] El término "latencia" según se usa en este documento, puede referirse a un efecto de blindaje que puede obstaculizar la interacción entre la proteína de fusión y otras moléculas de la superficie celular. Alternativamente, el término latencia se puede usar para describir una reducción en la actividad (hasta e incluida la ablación de la actividad) de una molécula/un agente asociado a la proteína de fusión. El término latencia también se puede referir a un efecto estabilizador de la proteína de fusión. El efecto puede ser total o parcial, donde el efecto parcial es suficiente para lograr la latencia del principio activo.

[0043] El principio farmacéuticamente activo puede ser una proteína farmacéuticamente activa que puede incluir, pero no exclusivamente, un factor de crecimiento (por ejemplo, TGFβ, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor

de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor estimulante de las colonias (CSF), factor de crecimiento de los hepatocitos, factor de crecimiento semejante a la insulina, factor de crecimiento de la placenta); un factor de diferenciación; una citocina por ejemplo una interleucina, (por ej. IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32 o IL-33 o un interferón (por ej. IFN- α , IFN- β y IFN- γ)), factor de necrosis tumoral (TNF), factor inductor de IFN- γ (IGIF), una proteína morfogenética ósea (BMP por ej. BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP10, BMP11, BMP-12, BMP-13); un antagonista del receptor de interleucina (por ej. IL-1ra, IL-1RII); una quimiocina (por ej. las MIP (proteínas inflamatorias de macrófagos) por ejemplo MIP1 α y MIP1 β ; las MCP (proteínas quimiotácticas de monocitos) por ej. MCP1, 2 o 3; RANTES (linfocito T normal expresado y secretado regulado por activación)); un factor trófico; un inhibidor de citocinas; un receptor de citocinas; una enzima secuestradora de radicales libres por ejemplo superóxido dismutasa o catalasa; una enzima convertidora de profármacos (por ejemplo, enzima convertidora de la angiotensina, desaminasas, deshidrogenasas, reductasas, cinasas y fosfatasa); un péptido mimético; un inhibidor de proteasas; un inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP por ej. TIMP1, TIMP2, TIMP3 o TIMP4) o una serpina (inhibidores de serina proteasas). Preferentemente, el principio farmacéuticamente activo se puede derivar de la especie que se va a tratar por ej. de origen humano para el tratamiento de seres humanos. Preferentemente, el principio farmacéuticamente activo es IFN β , IL-4 o IL-1ra.

[0044] Las interleucinas y citocinas pueden ser tanto antiinflamatorias como proinflamatorias. Las citocinas antiinflamatorias y ciertas interleucinas, como IL-4 o IL-10, son adecuadas para el tratamiento de la artritis, en tanto que las citosinas proinflamatorias y otras interleucinas, como IL-1 e IL-2, son adecuadas para el tratamiento del cáncer.

[0045] Según se usa en este documento "peptidomiméticos" incluye, pero no exclusivamente, agentes que tienen una conformación de esqueleto peptídico deseada incorporada en un esqueleto no peptídico que mantiene al péptido en una conformación particular. Los peptidomiméticos, que no tienen algunos de los inconvenientes de los péptidos, son de interés en aquellos casos en los que los péptidos no son adecuados en medicina.

[0046] Los peptidomiméticos pueden contener un esqueleto peptídico que sea de conformación L o D. Los ejemplos de peptidomiméticos son melanocortina, la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) y otros agentes de peptidomiméticos que desempeñan un papel en el sistema nervioso central, el sistema endocrino en la transducción de señales y en infección e inmunidad.

[0047] El principio farmacéuticamente activo puede consistir en un compuesto químico como un antineoplásico y otros fármacos sintéticos. Alternativamente, el principio farmacéuticamente activo puede consistir en un ARNip o una secuencia de un ácido péptido nucleico (PNA) por ejemplo, una secuencia de polilisina que se une a los ácidos nucleicos y permeabiliza las bicapas lipídicas (Wyman et al., *Biological Chemistry*, 379, 1045-1052 (1998)) o un péptido KALA que facilita la transferencia a través de la bicapa lipídica (Wyman et al., *Biochemistry*, 36, 3008-3017 (1997)) o un dominio de transducción de proteínas (DPT) que permite a los polipéptidos entrar en las células a través de la membrana plasmática (Pi et al *Molecular Therapy* 2, 339-347 (2000)).

[0048] La expresión "en asociación con" en el contexto de la presente invención pretende incluir todos los medios de asociación, entre otros, pero no exclusivamente, reticulación química o unión por enlace peptídico.

[0049] En una realización alternativa, la invención proporciona además la proteína de fusión de la presente invención opcionalmente en asociación con la proteína de unión a TGF β latente (LTBP). Generalmente, la proteína de fusión se une covalentemente a LTBP para formar un complejo. Preferentemente, la asociación es mediada por enlace(s) disulfuro entre Cys N° 33 de LAP y los tercer 8 residuos de Cys de LTBP. La LTBP asociada con la proteína de fusión puede incluir, pero no exclusivamente, LTBP 1, 2, 3 o 4 (Kanzaki et al., *Cell*, 61, 1051-1061 (1990); Tsuji et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8835-8839 (1990); Moren et al., *J. Biol. Chem.* 269, 32469-32478 (1994); Yin et al., *J. Biol. Chem.* 270, 10147-10160 (1995); Gibson et al., *Mol. Cell. Biol.* 15, 6932-6942 (1995); Saharinen et al., *J. Biol. Chem.* 273, 18459-18469 (1998)), o fragmentos de LTBP como los que contienen la tercera repetición de 8 Cys, u homólogos que tienen una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de identidad, empleando los parámetros predefinidos del programa informático BLAST provisto por HGMP, con la de LTBP.

[0050] La escisión de LTBP puede liberar a la proteína de fusión del complejo de LTBP. Las enzimas que pueden escindir a LTBP de esta manera son, pero no exclusivamente, trombospondina (Schultz et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 26783-26788 (1994); Crawford et al., *Cell*, 93, 1159-1170 (1998)), transglutaminasa (Nunes et al., *J. Cell. Biol.* 136, 1151-1163 (1997); Kojima et al., *The Journal of Cell Biology*, 121, 439-448 (1993)) MMP9 y MMP2 (Yu y Stamenkovic, *Genes and Dev*, 14, 163-176 (2000)).

[0051] La invención proporciona además ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión del primer aspecto de la invención según se definió antes. Un segundo aspecto de la invención proporciona un constructo de ácido

nucleico que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un principio farmacéuticamente activo, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un LAP, donde la secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión proteolítica por una agrecanasa se proporciona entre la primera y la segunda secuencias de ácido nucleico.

[0052] La expresión "constructo de ácido nucleico" se refiere en general a cualquier longitud de ácido nucleico que puede ser ADN, ADNc o ARN como ARNm obtenido por clonación o producido por síntesis química. El ADN puede ser monocatenario o bicatenario. El ADN monocatenario puede ser la hebra codificante sentido, o puede ser la hebra no codificante o antisentido. Para el uso terapéutico, el constructo de ácido nucleico está preferentemente en una forma capaz de ser expresada en el sujeto que se va a tratar.

[0053] Preferentemente, la primera secuencia de ácido nucleico codifica la proteína IFN β , IL-4 o IL-1ra. En una realización de la invención, la primera secuencia de ácido nucleico codifica a IFN β , IL-4 o IL-1ra de un ratón o un ser humano.

[0054] El constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención puede estar en forma de un vector, por ejemplo, un vector de expresión y puede incluir, entre otros, vectores cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus como el baculovirus, papova virus, como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de sus combinaciones, como los derivados de plásmidos y elementos genéticos de bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos. Generalmente, cualquier vector adecuado para mantener, propagar o expresar ácido nucleico a fin de expresar un polipéptido en un huésped, se puede usar para la expresión en este sentido.

[0055] La invención proporciona además una proteína codificada por el constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención opcionalmente en asociación con la proteína de unión a TGF β latente (LTBP) descrita antes. Habitualmente, la proteína codificada por el constructo de ácido nucleico se une covalentemente a LTBP para formar un complejo. Preferentemente, la asociación es mediada por enlace(s) disulfuro entre Cys N° 33 de LAP y los tercer 8 residuos de Cys de LTBP.

[0056] El constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención incluye preferentemente un promotor u otra secuencia reguladora que controla la expresión del ácido nucleico. Se han identificado y son conocidos en el área promotores y otras secuencias reguladoras que controlan la expresión de un ácido nucleico. Los expertos notarán que puede no ser necesario utilizar todo el promotor u otra secuencia reguladora. Sólo el elemento regulador esencial mínimo puede ser necesario y, de hecho, dichos elementos se pueden usar para construir secuencias quiméricas u otros promotores. El requisito esencial es, por supuesto, retener la especificidad tisular y/o temporal. El promotor puede ser cualquier promotor conocido adecuado, por ejemplo, el promotor del citomegalovirus (CMV) humano, el promotor inmediato temprano del CMV, la timidina cinasa de HSV, los promotores temprano y tardío de SV40 o los promotores de las LTR retrovirales, como las del virus del sarcoma de Rous (RSV) y los promotores de metalotionina como el promotor de la metalotionina-I de ratón. El promotor puede contener el mínimo implícito para la actividad del promotor (como elementos TATA sin elementos potenciadores) por ejemplo, la secuencia mínima del promotor del CMV.

[0057] Preferentemente, el promotor es contiguo a la primera y/o segunda secuencia de ácido nucleico.

[0058] Como se indica en este documento, el constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención puede estar en forma de un vector. Los vectores incluyen frecuentemente uno o más marcadores de expresión que permiten la selección de células transfectadas (o transformadas) con ellos, y preferentemente para permitir una selección de células que contengan vectores que incorporan ADN heterólogo. Generalmente estarán presentes una señal de inicio y de parada adecuadas.

[0059] Una realización de la invención se refiere a una célula que contiene el constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención. La célula se puede denominar una célula "huésped", que es útil para la manipulación del ácido nucleico, incluida la clonación. Alternativamente, la célula puede ser una célula en la cual obtener la expresión del ácido nucleico. Los ejemplos representativos de células huésped adecuadas para la expresión del constructo de ácido nucleico de la invención incluyen células empaquetadoras de virus que permiten la encapsulación del ácido nucleico en un vector viral; células bacterianas, como *Streptococci*, *Staphylococci*, *E.coli*, *Streptomyces* y *Bacillus Subtilis*; células individuales, como células de levadura, por ejemplo, células de *Saccharomyces Cerevisiae* y *Aspergillus*; células de insectos como células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*, células de animales como células CHO, COS, C127, 3T3, PHK.293 y de melanoma de Bowes y otras células humanas adecuadas; y células de vegetales, por ej. *Arabidopsis thaliana*.

[0060] La inducción de un vector de expresión en la célula huésped se puede ver afectada por transfección con

fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción balística, infección u otros métodos. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, como Sambrook et al, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, segunda edición Coldspring Harbor Laboratory Press, Coldspring Harbor, N.Y. (1989).

[0061] Las proteínas maduras se pueden expresar en células huésped, que incluyen células de mamíferos como las células CHO, de levadura, de bacterias u otras células bajo el control de los promotores apropiados. Se pueden emplear sistemas de traducción acelulares para producir tales proteínas con ARN derivados del constructo de ácido nucleico del tercer aspecto de la presente invención. Vectores de clonación y de expresión adecuados para usar con células huésped procariotas y eucariotas son descritos por Sambrook et al, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, segunda edición, Coldspring Harbor Laboratory Press, Coldspring Harbor, N.Y. (1989).

[0062] Las proteínas se pueden recuperar y purificar de cultivos celulares recombinantes por métodos bien conocidos, como precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxipatita, cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía con lectina y/o heparina. Para la terapia, el constructo de ácido nucleico, por ejemplo en forma de un vector recombinante, se puede purificar por técnicas conocidas en el área, como por medio de cromatografía en columna según describen Sambrook et al, en Molecular Cloning, a Laboratory Manual, segunda edición, Coldspring Harbor Laboratory Press, Coldspring Harbor, N.Y. (1989).

[0063] Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición de conformidad con el primer aspecto de la invención para utilizar en el tratamiento de la artritis o el cáncer. Este aspecto de la invención se extiende por lo tanto al uso, y lo incluye, de una proteína de fusión que comprende un péptido asociado a la latencia (LAP) unido por un sitio de escisión proteolítica por una agreganasa a un principio farmacéuticamente activo como el definido en el primer aspecto de la invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la artritis o el cáncer.

[0064] La presente invención proporciona una composición como la que se describe antes para su uso en el tratamiento de la artritis o el cáncer. Artritis define un grupo de enfermedades (o artropatías) en las que el daño es causado a las articulaciones del cuerpo e incluye artrosis (también conocida como enfermedad degenerativa de las articulaciones) que puede aparecer después de un traumatismo en la articulación, después de una infección en la articulación o a consecuencia del envejecimiento. Otras formas de artritis incluyen la artritis reumatoide y la artritis psoriásica, que son enfermedades autoinmunitarias, y la artritis séptica causada por infección en las articulaciones. El cáncer define un grupo de enfermedades caracterizadas por una proliferación anormal de células en el cuerpo, que pueden ser definidas como tumores, por ejemplo glioblastoma. El glioblastoma también se conoce a veces como astrocitoma de grado 4.

[0065] En un cuarto aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico de conformidad con el segundo aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de la artritis o el cáncer. Este aspecto se extiende por lo tanto al uso, y lo incluye, de un constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la artritis o el cáncer. Cuando se utiliza el constructo de ácido nucleico en el tratamiento terapéutico, el constructo se puede utilizar como parte de un constructo de expresión, por ejemplo, en forma de un vector de expresión como un plásmido o un virus. El constructo se puede administrar por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, oral o por otras vías.

[0066] El constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención y las proteínas derivadas de éste, se pueden emplear solos o en combinación con otros compuestos, como compuestos terapéuticos, por ejemplo antiinflamatorios, citotóxicos, citostáticos o antibióticos. Los constructos de ácido nucleico y las proteínas útiles en la presente invención se proporcionan preferentemente en forma aislada, y preferentemente se purifican hasta la homogeneidad.

[0067] Según se usa en este documento, el término "tratamiento" incluye cualquier régimen que pueda beneficiar a un ser humano o a un animal no humano. El tratamiento de "animales no humanos" se extiende al tratamiento de animales domésticos, incluidos caballos y animales de compañía (por ej. perros y gatos) y animales de granja o establecimientos agrícolas como los miembros de las familias ovina, caprina, porcina, bovina y equina. El tratamiento puede ser en este sentido de cualquier afección o trastorno existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). El tratamiento puede ser de una enfermedad heredada o adquirida. El tratamiento puede ser de una afección aguda o crónica. Preferentemente, el tratamiento es de una afección/trastorno asociado a inflamación. La primera secuencia de ácido nucleico del constructo de ácido nucleico del tercer aspecto de la invención puede codificar una proteína para usar en el tratamiento del trastorno, incluidos pero no exclusivamente, artrosis, esclerodermia, enfermedad renal, artritis reumatoide, enfermedad del intestino irritable, esclerosis múltiple, aterosclerosis, cáncer o cualquier enfermedad inflamatoria.

[0068] El constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención se puede usar terapéuticamente a manera de genoterapia. Alternativamente, la proteína codificada por el constructo de ácido nucleico se puede administrar directamente como se describe en este documento.

[0069] La administración del constructo de ácido nucleico del segundo aspecto se puede dirigir al sitio de destino por métodos físicos. Los ejemplos de esto incluyen la administración tópica del ácido nucleico "desnudo" en forma de un vector en un vehículo apropiado, por ejemplo, en solución en un excipiente farmacéuticamente aceptable, como solución salina tamponada con fosfato, o la administración de un vector por métodos físicos tales como el bombardeo de partículas según métodos conocidos en el área.

[0070] Otros métodos físicos para la administración del constructo de ácido nucleico o las proteínas del tercer aspecto de la invención directamente al destinatario incluyen ultrasonido, electroestimulación, electroporación y microsiembra. Otros métodos de administración incluyen la administración oral o la administración por inhalación.

[0071] Se prefiere particularmente el modo de administración de microsiembra que es un sistema para administrar material genético a las células *in situ* en un paciente. Este método se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5697901.

[0072] El constructo de ácido nucleico de conformidad con el segundo aspecto de la invención también se puede administrar mediante vectores de administración. Estos incluyen vectores de administración virales, como vectores de administración de adenovirus, retrovirus o lentivirus conocidos en el área.

[0073] Otros vectores de administración no virales incluyen vectores de administración lipídicos, como los vectores de administración liposómicos conocidos en el área.

[0074] La administración también puede tener lugar a través de células huésped transformadas. Dichas células incluyen células extraídas del sujeto, a las cuales se transfiere un constructo de ácido nucleico por métodos de transferencia génica conocidos en el área. Seguido de la multiplicación de las células transformadas en cultivo y su injerto en el sujeto.

[0075] Según se usa en este documento, el término "genoterapia" se refiere a la introducción de genes mediante ingeniería genética de recombinación de las células del cuerpo (genoterapia somática) para el beneficio del paciente. Además, la genoterapia se puede dividir en técnicas *ex vivo* e *in vivo*. La genoterapia *ex vivo* se refiere a la extracción de células del cuerpo de un paciente, al tratamiento de las células extraídas con un vector es decir un vector recombinante, y el posterior retorno de las células tratadas al paciente. La genoterapia *in vivo* se refiere a la administración directa del vector génico recombinante mediante, por ejemplo, medios intravenosos o intravasculares.

[0076] Preferentemente la genoterapia se lleva a cabo *ex vivo*.

[0077] Preferentemente, para un constructo de ácido nucleico que se va a usar en genoterapia, el vector de expresión de la presente invención se expresa en el sujeto que se va a tratar. Por lo tanto, para la genoterapia humana, el promotor es preferentemente un promotor humano de un gen humano o de un gen que se expresa normalmente en los seres humanos, como el promotor del CMV humano.

[0078] Para la genoterapia, la presente invención proporciona un constructo de ácido nucleico como el definido antes para el uso en la manipulación de las células somáticas de los mamíferos humanos y no humanos, o la manipulación de las células de la línea germinal de un mamífero no humano.

[0079] La presente invención proporciona, por lo tanto, una proteína terapéutica preparada a partir de células humanas que han sido tratadas *in vitro* para insertar en ellas un constructo de ácido nucleico de conformidad con el segundo aspecto de la invención.

[0080] La manipulación de las células extraídas de un paciente es con el constructo de ácido nucleico del tercer aspecto de la invención en un vector apropiado. Según se usa en este documento, la expresión "células manipuladas" abarca células transfectadas con un vector recombinante.

[0081] También se contempla el uso de células transfectadas en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la artritis o el cáncer.

[0082] La presente invención también puede encontrar aplicación en medicina veterinaria para el tratamiento/la profilaxis de animales domésticos como caballos y animales de compañía (por ej. perros y gatos) y animales de granja que pueden incluir mamíferos de las familias ovina, porcina, caprina, bovina y equina.

[0083] La presente invención también se refiere a composiciones que contienen el constructo de ácido nucleico o las

proteínas del primer o segundo aspecto de la invención. Por consiguiente, la proteína de fusión o los constructos de ácido nucleico de la presente invención se pueden emplear en combinación con un portador o portadores farmacéuticamente aceptables. Dichos portadores pueden ser, entre otros, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, liposomas, agua, glicerol, etanol y sus combinaciones.

[0084] Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de cualquier manera eficaz y conveniente, que sea eficaz para tratar una enfermedad en un paciente como, por ejemplo, mediante administración por vías oral, tópica, intravenosa, intramuscular, intranasal o intradérmica, entre otras. En terapia o como profilaxis, el principio activo se puede administrar a un individuo como una composición inyectable, por ejemplo como una dispersión acuosa estéril, preferentemente isotónica.

[0085] Para la administración a mamíferos, y particularmente a seres humanos, se espera que la dosis diaria del principio activo sea de 0.01 mg/kg de peso corporal, habitualmente de alrededor de 1 mg/kg. En cualquier caso el médico determinará la dosis real que será más conveniente para un individuo que dependerá de factores como la edad, el peso, el género y la respuesta del individuo. Las dosis anteriores son ejemplos del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos que ameriten una dosis mayor o menor, y éstas están comprendidas por el alcance de esta invención.

[0086] Un sexto aspecto de la invención proporciona una proteína de fusión que contiene un LAP y un sitio de escisión proteolítica por una agreganasa donde la proteína de fusión se asocia con un principio farmacéuticamente activo. El principio farmacéuticamente activo puede ser según se describió antes. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el principio farmacéuticamente activo puede ser un ARNip o una molécula de PNA.

[0087] La invención proporciona además un constructo de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión del sexto aspecto de la invención. El constructo de ácido nucleico contiene preferentemente una secuencia de ácido nucleico que codifica un LAP adyacente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión proteolítica por una agreganasa. Preferentemente, la secuencia de ácido nucleico que codifica un LAP está unida operablemente de manera adecuada a una secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión proteolítica por una agreganasa.

[0088] La invención proporciona además la proteína de fusión del sexto aspecto de la invención opcionalmente en asociación con la proteína de unión a TGF β latente (LTBP) descrita aquí.

[0089] La proteína de fusión del sexto aspecto de la invención puede estar asociada con el principio farmacéuticamente activo por medio de una unión por enlace peptídico. Alternativamente, la proteína de fusión se puede asociar con el principio farmacéuticamente activo por medio de unión química por ejemplo por reticulación de la proteína de fusión con un compuesto químico como un antineoplásico, un fármaco sintético o PNA.

[0090] Preferentemente, el principio farmacéuticamente activo está unido al extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión proteolítica en la proteína de fusión del séptimo aspecto de la invención. Más preferentemente, el principio farmacéuticamente activo es continuo con el residuo C-terminal de la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión proteolítica por una agreganasa.

[0091] La proteína de fusión y el principio farmacéuticamente activo asociado del sexto aspecto de la invención, se pueden emplear solos o en combinación con otros compuestos, como compuestos terapéuticos, por ejemplo antiinflamatorios, citotóxicos, citostáticos o antibióticos. Dicha administración puede ser simultánea, por separado o secuencial. Los componentes se pueden preparar en forma de un kit que puede contener instrucciones según sea adecuado.

[0092] Preferentemente, la proteína de fusión y el principio farmacéuticamente activo asociado del sexto aspecto de la invención se administran directamente a un paciente como se describe en este documento.

[0093] La presente invención también se refiere a composiciones que contienen la proteína de fusión y el principio farmacéuticamente activo asociado del sexto aspecto de la invención. Por consiguiente, la proteína de fusión y el principio farmacéuticamente activo asociado se pueden emplear en combinación con el portador o los portadores farmacéuticamente aceptables. Dichos portadores pueden ser, entre otros, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, liposomas, agua, glicerol, polietilenglicol, etanol y sus combinaciones. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de cualquier manera eficaz y conveniente, que sea eficaz para tratar una enfermedad en un paciente como, por ejemplo, mediante administración por vías oral, tópica, intravenosa, intramuscular, intranasal o intradérmica entre otras. En terapia o como profilaxis, el principio activo se puede administrar a un individuo como una composición inyectable, por ejemplo como una dispersión acuosa estéril, preferentemente isotónica.

[0094] Un séptimo aspecto de la invención proporciona un kit de piezas que consiste en una proteína de fusión del

primer aspecto de la invención, un constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención, o una proteína de fusión y un principio farmacéuticamente activo asociado, de conformidad con el sexto aspecto de la invención, y un vehículo de administración que incluye, sin limitación, comprimidos para administración oral, inhaladores para administración pulmonar y soluciones inyectables para administración intravenosa.

[0095] Un octavo aspecto de la invención proporciona un proceso para preparar la proteína de fusión del primer aspecto de la invención, que comprende la producción de la proteína de fusión por vía recombinante por expresión en una célula huésped, la purificación de la proteína de fusión expresada y la asociación del principio farmacéuticamente activo a la proteína de fusión purificada por medio de la unión por enlace peptídico, enlace de hidrógeno o salino o reticulación química. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, en las que el principio farmacéuticamente activo es un péptido, la proteína de fusión se podría preparar usando enlaces de hidrógeno o salinos en los que el péptido es capaz de multimerización, por ejemplo dimerización o trimerización.

[0096] Un noveno aspecto de la invención proporciona un proceso para preparar un constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención que comprende ligar secuencias de ácidos nucleicos que codifican un péptido asociado a la latencia, una secuencia de escisión por una agrecanasa y un principio farmacéuticamente activo, incluida opcionalmente una secuencia conectora a ambos lados del sitio de escisión por una agrecanasa.

[0097] Una realización preferida de la presente invención estipula un método para proporcionar latencia a un principio farmacéuticamente activo que es una citocina, preferentemente interferón o una interleucina, donde el método comprende construir una proteína de fusión que tenga un péptido asociado a la latencia (LAP), a partir de TGFβ-1, -2, -3, -4 o -5, asociada con un sitio de escisión proteolítica por una agrecanasa elegido entre los sitios de escisión por ADAMTS-4 o ADAMTS-5, y el principio farmacéuticamente activo. Preferentemente, el principio farmacéuticamente activo es seguido de un sitio de escisión proteolítica y el LAP de la manera siguiente: LAP-sitio de escisión-principio activo.

[0098] Todas las características preferidas del segundo aspecto y aspectos subsiguientes de la invención son en cuanto al primer aspecto *mutatis mutandis*.

[0099] La presente invención se describirá ahora sólo a modo de ejemplo con referencia a las figuras acompañantes en las cuales:

La figura 1 muestra secuencias de aminoácidos del dominio precursor de TGFβ 1, 2 y 3 (humano, Hu), TGFβ 4 (pollo, Ck), TGFβ (rana, Fg). Las flechas indican la posición del procesamiento proteolítico resultante en la escisión del péptido señal de TGFβ1 y de los TGFβ maduros. Los sitios de glucosilación unidos por N están subrayados, como lo está la secuencia de reconocimiento celular de la integrina (Roberts y Sporn, Peptide Growth Factors and their Receptors: Sporn, MB y Roberts, AB, Springer-Verlag, capítulo 8, 422 (1996));

La figura 2 muestra una alineación de secuencias múltiples de las secuencias del epítipo de ADAMTS-4 con el correspondiente porcentaje promedio de escisión de fagémidos y el motivo de escisión de ADAMTS-4 derivado. Los aminoácidos predominantes encontrados con una frecuencia superior a 40% en una posición particular se ilustran con un fondo negro, en contraste con los aminoácidos relacionados que se muestran con un fondo gris (reproducido de Hills et al J. Biol. Chem. 282 11101-11109 (2007)).

La figura 3 muestra el desarrollo de LAP-IL-4 sensible a ADAMTS-4. Inmunotransferencia tipo Western de los sobrenadantes de células 293T transfectadas transitoriamente sondadas con el anticuerpo anti-IL-4. Los sobrenadantes exentos de suero se recolectaron 48 h después de la transfección y se incubaron toda la noche a 37 °C sin (-) o con (+) MMP-1 recombinante o agrecanasa (ambos proporcionados amablemente por H. Nagase, Kennedy Institute). Tenga en cuenta la especificidad de la escisión LAP-MMP IL-4 es sólo escindida por MMP-1, mientras que los constructos Agg1 y Agg2 son escindidos por ADAMTS-4 pero no por MMP-1. Agg1 y Agg2 corresponden a las secuencias B05 y B06 de Hills et al. (J. Biol. Chem 282(15):11101-11109; (2007)).

Las figuras 4 y 5 muestran el marco de lectura abierto completo y la secuencia de ADN de ambos constructos de la agrecanasa. Las secuencias GGGS antes y después del sitio de la agrecanasa están en *italicas*, los sitios de clonación EcoR1 y Not1 están ambos en *negrita* y subrayados. Los sitios sensibles a la agrecanasa están en *negrita*. El mL-4 tiene una cola poli histidina y un epítipo etiquetado en el extremo COOH. La figura 4 muestra el constructo con el sitio de escisión B06 y la figura 5 muestra el constructo con el sitio de escisión B05.

[0100] La invención se describirá ahora con referencia a los ejemplos no limitantes siguientes;

Experimento 1 Desarrollo de LAP-IL-4 sensible a ADAMTS-4

[0101] Los sitios de escisión por una agrecanasa B05 y B06 reportados por Hills et al (J. Biol. Chem. 282: 11101-11109 (2007)) fueron flanqueados en ambos lados por el conector (GGGS)₃ usando oligodesoxinucleótidos

superpuestos que se clonaron entre los sitios EcoR1 y Not1 del constructo LAP-IL-4 (véase Figura 4 o 5).

[0102] Para clonar los sitios de escisión por una agrecanasa en LAP-mIL-4, los oligonucleótidos siguientes que codifican los sitios de escisión B05 y B06 se purificaron por HPLC para la clonación.

5 B06: DVQEFRGVTAVIR con GGGGS en cada extremo

Aat II

1. sense (B06)5' aattc GGA GGC GGG GGT TCA GAC GTC CAA GAA TTC CGC
GGC GTC ACA GCT GTG ATC CGT GGA GGC GGG GGT TCA gc

2. antisense (B06)5' ggc cgc TGA ACC CCC GCC TCC ACG GAT CAC AGC TGT
GAC GCC GCG GAA TTC TTG GAC GTC TGA ACC CCC GCC TCC g

10

B05: HNEFRQRETYMVF con GGGGS en cada extremo

BamH1

3. sense(B05) 5' aattc GGA GGC GGG GGA TCC CAC AAC GAG TTC CGA CAG
CGG GAG ACA TAT ATG GTC TTC GGA GGC GGG GGT TCA gc

4. antisense (B05) 5' ggc cgc TGA ACC CCC GCC TCC GAA GAC CAT ATA TGT
CTC CCG CTG TCG GAA CTC GTT GTG GGA TCC CCC GCC TCC g

15

[0103] Para preparar el constructo final, el constructo LAP-mIL4 se cortó con EcoR1 y Not1 y se purificó el fragmento grande producido. Después del apareamiento de los oligonucleótidos las secuencias de escisión se clonaron dentro de ellos. Los clones positivos se enviaron para secuenciación del ADN. B05 tiene un nuevo sitio Aat II, y B06 tiene un sitio BamH1.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

[0104]

25

<110> Queen Mary & westfield college Chernajovsky, Yuti Adams, Gillian
<120> Latency Associated protein Construct with Aggreacanase sensitive Cleavage Site

<130> P44260WO/NCB

<150> GB 0724556.6

< 151> 2007-12-17

30

<160> 67

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

< 211> 390

< 212> PRT

35

< 213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 552 018 T3

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

Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp Ser
180 185 190

Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg Gln Trp Leu
195 200 205

Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala His Cys Ser
210 215 220

Gly Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn Gly Phe Thr
225 230 235 240

Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met Trp Arg Pro
245 250 255

Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln Lys Leu Gln
260 265 270

Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser
275 280 285

Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys
290 295 300

Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn
305 310 315 320

Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr
325 330 335

Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala
340 345 350

Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr
355 360 365

Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val
370 375 380

Arg Ser Cys Lys Cys Ser
385 390

<210> 2

<211> 414

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met His Tyr Cys Val Leu Ser Ala Phe Leu Ile Leu His Leu Val Thr
1 5 10 15

Val Ala Leu Ser₂₀ Leu Ser Thr Cys₂₅ Ser Thr Leu Asp Met₃₀ Asp Gln Phe
 Met Arg Lys₃₅ Arg Ile Glu Ala Ile₄₀ Arg Gly Gln Ile₄₅ Leu Ser Lys Leu
 Lys Leu Thr Ser Pro Pro₅₅ Glu Asp Tyr Pro Glu₆₀ Pro Glu Glu Val Pro
 Pro Glu Val Ile Ser Ile₇₀ Tyr Asn Ser Thr₇₅ Arg Asp Leu Leu Gln Glu₈₀
 Lys Ala Ser Arg₈₅ Arg Ala Ala Ala Cys₉₀ Glu Arg Glu Arg Ser₉₅ Asp Glu
 Glu Tyr Tyr Ala₁₀₀ Lys Glu Val Tyr₁₀₅ Lys Ile Asp Met Pro₁₁₀ Pro Phe Phe
 Pro Ser Glu₁₁₅ Asn Ala Ile Pro₁₂₀ Pro Thr Phe Tyr Arg₁₂₅ Pro Tyr Phe Arg
 Ile Val Arg Phe Asp Val₁₃₅ Ser Ala Met Glu Lys₁₄₀ Asn Ala Ser Asn Leu
 Val Lys Ala Glu Phe₁₅₀ Arg Val Phe Arg Leu₁₅₅ Gln Asn Pro Lys Ala Arg₁₆₀
 Val Pro Glu Gln₁₆₅ Arg Ile Glu Leu Tyr₁₇₀ Gln Ile Leu Lys Ser₁₇₅ Lys Asp
 Leu Ile Ser₁₈₀ Pro Thr Gln Arg Tyr₁₈₅ Ile Asp Ser Lys Val₁₉₀ Val Lys Thr
 Arg Ala Glu Gly Glu Trp Leu₂₀₀ Ser Phe Asp Val Thr₂₀₅ Asp Ala Val His
 Glu Trp₂₁₀ Leu His His Lys₂₁₅ Asp Arg Trp Leu Gly₂₂₀ Phe Lys Ile Ser Leu
 His₂₂₅ Cys Pro Cys Cys Thr₂₃₀ Phe Val Pro Ser₂₃₅ Asn Asn Tyr Ile Ile Pro₂₄₀
 Asn Lys Ser Glu₂₄₅ Glu Leu Glu Ala Arg₂₅₀ Phe Ala Gly Ile Asp₂₅₅ Gly Thr
 Ser Thr Tyr Thr₂₆₀ Ser Gly Asp Gln₂₆₅ Lys Thr Ile Lys Ser₂₇₀ Thr Arg Lys
 Lys Asn Ser₂₇₅ Gly Lys Thr Pro His₂₈₀ Leu Leu Leu Met₂₈₅ Leu Leu Pro Ser

Tyr Arg Leu Glu Ser Gln Gln Thr Asn Arg Arg Lys Lys Arg Ala Leu
290 295 300

Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg
305 310 315 320

Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His
325 330 335

Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys Pro Tyr
340 345 350

Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn
355 360 365

Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp
370 375 380

Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Ile Pro Lys Ile
385 390 395 400

Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
405 410

<210> 3

<211> 412

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Lys Met His Leu Gln Arg Ala Leu Val Val Leu Ala Leu Leu His
1 5 10 15

Phe Ala Thr Val Ser Leu Ser Leu Ser Thr Cys Thr Thr Leu Asp Phe
20 25 30

Gly His Ile Lys Lys Lys Arg Val Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu
35 40 45

Ser Lys Leu Arg Leu Thr Ser Pro Pro Glu Pro Thr Val Met Thr His
50 55 60

Val Pro Tyr Gln Val Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Glu Leu Leu
65 70 75 80

Glu Glu His Gly Glu Arg Lys Glu Glu Gly Cys Thr Gln Glu Asn Thr
85 90 95

Glu Ser Glu Tyr Tyr Ala Lys Glu Ile His Lys Phe Asp Met Ile Gln
100 105 110

Gly Leu Ala Glu His Asn Glu Leu Ala Val Cys Pro Lys Gly Ile Thr

115	120	125
Ser Lys Val Phe Arg Phe	Asn Val Ser Ser Val	Glu Lys Asn Arg Thr
130	135	140
Asn Leu Phe Arg Ala Glu	Phe Arg Val Leu Arg Val	Pro Asn Pro Ser
145	150	155
160		
Ser Lys Arg Asn Glu Gln Arg Ile	Glu Leu Phe Gln Ile	Leu Arg Pro
165	170	175
Asp Glu His Ile Ala Lys Gln Arg	Tyr Ile Gly Gly Lys	Asn Leu Pro
180	185	190
Thr Arg Gly Thr Ala Glu Trp	Leu Ser Phe Asp Val	Thr Asp Thr Val
195	200	205
Arg Glu Trp Leu Leu Arg	Arg Glu Ser Asn Leu	Gly Leu Glu Ile Ser
210	215	220
Ile His Cys Pro Cys His	Thr Phe Gln Pro	Asn Gly Asp Ile Leu Glu
225	230	235
240		
Asn Ile His Glu Val Met Glu Ile	Lys Phe Lys Gly Val	Asp Asn Glu
245	250	255
Asp Asp His Gly Arg Gly Asp	Leu Gly Arg Leu Lys	Lys Gln Lys Asp
260	265	270
Asn Asn Asn Pro His Leu Ile	Leu Met Met Ile Pro	Pro His Arg Leu
275	280	285
Asp Asn Pro Gly Gln Gly	Gly Gln Arg Lys Lys	Arg Ala Leu Asp Thr
290	295	300
Asn Tyr Cys Phe Arg	Asn Leu Glu Glu	Asn Cys Cys Val Arg Pro Leu
305	310	315
320		
Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp	Leu Gly Trp Lys Trp Val	His Glu Pro
325	330	335
Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe	Cys Ser Gly Pro Cys Pro	Tyr Leu Arg
340	345	350
Ser Ala Asp Thr Thr His	Ser Thr Val Leu Gly Leu	Tyr Asn Thr Leu
355	360	365
Asn Pro Glu Ala Ser Ala	Ser Pro Cys Cys Val	Pro Gln Asp Leu Glu
370	375	380
385		
Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr	Val Gly Arg Ile Pro	Lys Val Glu Gln
390	395	400
Leu Ser Asn Met Val Val	Lys Ser Cys Lys Cys Ser	
405	410	

5 <210> 4
 <211> 304
 <212> PRT

ES 2 552 018 T3

< 213> Gall us gallus
<400> 4

Met Asp Pro Met Ser Ile Gly Pro Lys Ser Cys Gly Gly Ser Pro Trp
1 5 10 15

Arg Pro Pro Gly Thr Ala Pro Trp Ser Ile Gly Ser Arg Arg Ala Thr
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Cys Ser Thr Ser Ser Arg Val Arg Ala Glu Val Gly
35 40 45

Gly Arg Ala Leu Leu His Arg Ala Glu Leu Arg His Leu Arg Gln Lys
50 55 60

Ala Ala Ala Asp Ser Ala Gly Thr Glu Gln Arg Leu Glu Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Gly Tyr Gly Asn Ala Ser Trp Arg Tyr Leu His Gly Arg Ser Val Arg
85 90 95

Ala Thr Ala Asp Asp Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Ala Val
100 105 110

His Gln Trp Leu Ser Gly Ser Glu Leu Ile Gly Val Phe Lys Leu Ser
115 120 125

Val His Cys Pro Cys Glu Met Gly Pro Gly His Ala Asp Glu Met Arg
130 135 140

Ile Ser Ile Glu Gly Phe Glu Gln Gln Arg Gly Asp Met Gln Ser Ile
145 150 155 160

Ala Lys Lys His Arg Arg Val Pro Tyr Val Leu Ala Met Ala Leu Pro
165 170 175

Ala Glu Arg Ala Asn Glu Leu His Ser Ala Arg Arg Arg Arg Asp Leu
180 185 190

Asp Thr Asp Tyr Cys Phe Gly Pro Gly Thr Asp Glu Lys Asn Cys Cys
195 200 205

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gln Trp Lys Trp
210 215 220

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Met Ala Asn Phe Cys Met Gly Pro Cys
225 230 235 240

Pro Tyr Ile Trp Ser Ala Asp Thr Gln Tyr Ile Lys Val Leu Ala Leu
245 250 255

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro
260 265 270

Gln Ile Leu Asp Pro Leu Pro Ile Ile Tyr Tyr Val Gly Arg Asn Val
275 280 285

Arg Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Arg Ala Cys Lys Cys Ser
290 295 300

<210> 5
 < 211> 383
 < 212> PRT
 < 213> xenopus laevis
 <400> 5

5

```

Met Glu Val Leu Trp Met Leu Leu Val Leu Leu Val Leu His Leu Ser
 1           5           10           15

Ser Leu Ala Asn Ser Leu Ser Thr Cys Lys Ala Val Asp Met Glu Glu
          20           25           30

Val Arg Lys Arg Arg Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys
      35           40           45

Leu Lys Leu Asp Lys Ile Pro Asp Val Asp Ser Glu Lys Met Thr Val
   50           55           60

Pro Ser Glu Ala Ile Phe Leu Tyr Asn Ser Thr Leu Glu Val Ile Arg
 65           70           75           80

Glu Lys Ala Thr Arg Glu Glu Glu Glu His Val Gly His Asp Gln Asn
          85           90           95
-----
Ile Gln Asp Tyr Tyr Ala Lys Gln Val Tyr Arg Phe Glu Ser Ile Thr
      100           105           110

Glu Leu Glu Asp His Glu Phe Lys Phe Lys Phe Asn Ala Ser His Val
   115           120           125

Arg Glu Asn Val Gly Met Asn Ser Leu Leu His His Ala Glu Leu Arg
 130           135           140

Met Tyr Lys Lys Gln Thr Asp Lys Asn Met Asp Gln Arg Met Glu Leu
145           150           155           160
    
```

Phe Trp Lys Tyr Gln Glu Asn Gly Thr Thr His Ser Arg Tyr Leu Glu
 165 170 175
 Ser Lys Tyr Ile Thr Pro Val Thr Asp Gln Glu Trp Asn Ser Phe Asp
 180 185 190
 Val Thr Lys Thr Val Asn Glu Trp Leu Lys Arg Ala Glu Glu Asn Glu
 195 200 205
 Gln Phe Gly Leu Gln Pro Ala Gly Lys Gly Pro Thr Pro Gln Ala Lys
 210 215 220
 Asp Ile Asp Ile Glu Gly Phe Pro Ala Leu Arg Gly Asp Leu Ala Ser
 225 230 235 240
 Leu Ser Ser Lys Glu Asn Thr Lys Pro Tyr Leu Met Ile Thr Ser Met
 245 250 255
 Pro Ala Glu Arg Ile Asp Thr Val Thr Ser Ser Arg Lys Lys Arg Gly
 260 265 270
 Val Gly Gln Glu Tyr Cys Phe Gly Asn Asn Gly Pro Asn Cys Cys Val
 275 280 285
 Lys Pro Leu Tyr Ile Asn Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile
 290 295 300
 His Glu Pro Lys Gly Tyr Glu Ala Asn Tyr Cys Leu Gly Asn Cys Pro
 305 310 315 320
 Tyr Ile Trp Ser Met Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ser Leu Tyr
 325 330 335
 Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ile Ser Pro Cys Cys Val Pro Asp
 340 345 350
 Val Leu Glu Pro Leu Pro Ile Ile Tyr Tyr Val Gly Arg Ile Ala Lys
 355 360 365
 Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Arg Ser Cys Asn Cys Ser
 370 375 380

<210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 6

Met Met Phe Lys Gly Gln Arg Val Glu Arg Val Leu Thr

1 5 10

<210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 7

His Asn Glu Phe Arg Gln Arg Glu Thr Tyr Met Val Phe
 1 5 10
 <210> 8
 < 211> 13
 5 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 8
 10
 Asn Trp Gln Glu Phe Gln Ala Lys Arg Ser Val Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 9
 < 211> 13
 15 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 9
 20 Leu Glu Leu Lys Ser Asn Ser Val Ile Met Arg Trp Pro
 1 5 10
 <210> 10
 < 211> 13
 25 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 10
 Asp Tyr Met Glu Val Arg Arg Gln Met Ser Met Gln Met
 1 5 10
 30
 <210> 11
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 35 <220>
 < 223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 11
 Ala Leu Glu Met Arg Ala Ala Asp Val Glu Tyr His Phe
 1 5 10
 40
 <210> 12
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 45 < 223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 12
 Val Glu His Leu Met Glu Val Gln Arg Lys Thr Thr Trp
 1 5 10
 50
 <210> 13
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 55 < 223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 13
 Gly Val Glu Val Lys Arg Gln Leu Ser Tyr His Tyr Met
 1 5 10

<210> 14
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 5 <220>
 < 223> synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 14
 Gln Glu Leu Val Gly Ala Asn Ile Glu Thr Tyr Met Leu
 1 5 10
 <210> 15
 10 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 15
 Gln Gln Met Glu Val Ser Arg Tyr Val Gln Tyr Lys Trp
 1 5 10
 <210> 16
 < 211> 13
 < 212> PRT
 20 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 16
 Leu Gln Ser Phe Arg Gln Ala Pro Val Asp Ile Trp Trp
 1 5 10
 <210> 17
 < 211> 13
 < 212> PRT
 25 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 17
 Gln Glu Leu Arg Gly Lys Ile Ser Ile Gln Pro Phe Lys
 1 5 10
 <210> 18
 < 211> 13
 < 212> PRT
 35 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 18
 Gln Gln Glu Tyr Met Ser Gly Gln Tyr Asp Ile Ile Phe
 1 5 10
 <210> 19
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 45 <220>
 < 223> Synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 19
 Ser Met Glu Phe Ala Ala Thr Val Thr Ser Thr Phe Glu
 1 5 10
 <210> 20
 50 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 20
 Glu Gln Gln Leu Lys Gly Arg Gln Thr His Ile Ile Ile
 1 5 10
 <210> 21
 < 211> 13

< 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 5 <400> 21
Met Glu Leu Lys Gly Gln Thr Asp Met Phe Tyr Ile Ile
1 5 10
 <210> 22
 < 211> 13
 < 212> PRT
 10 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 22
Gly Ala Tyr Ala Val Gly Arg Trp Ser Tyr Val Asp Ala
1 5 10
 15 <210> 23
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 20 < 223> synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 23
Gly Gln Phe Ala Thr Ser Pro Lys Ile Thr Ile His Lys
1 5 10
 <210> 24
 < 211> 13
 25 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 24
Asp Val Gln Glu Phe Arg Gly Val Thr Ala Val Ile Arg
1 5 10
 30 <210> 25
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 35 <220>
 < 223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 25
His Glu Ala Arg Thr Val Ser Thr Thr Tyr Leu Met Leu
1 5 10
 <210> 26
 < 211> 13
 40 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 45 <400> 26
Tyr Met Glu Met Arg Gly Ser Thr Thr Val Phe Phe Asn
1 5 10
 <210> 27
 < 211> 13
 < 212> PRT
 50 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 27
Gln Glu Leu Ile Gly Ser Tyr Ser Val Met Pro Thr Asn
1 5 10
 55 <210> 28
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence

<220>
 < 223> Synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 28
 His Tyr Tyr Met Glu Ala Thr Arg Asp Ile Glu Met Val
 1 5 10
 5 <210> 29
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 10 < 223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 29
 Asn Glu Ala His Ser Ser Gly Ile Thr Ile Met Leu Arg
 1 5 10
 <210> 30
 < 211> 13
 15 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 30
 Asp His Pro Met Glu Phe Arg Ser Lys Ile Thr Met Lys
 1 5 10
 20 <210> 31
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 25 <220>
 < 223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 31
 Thr Phe Ala Glu Met Lys Gly Thr Val Ser Tyr Ala Leu
 1 5 10
 <210> 32
 30 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 35 <400> 32
 Gly Val His Met Glu Ser Met Arg Arg Tyr Thr Val Ile
 1 5 10
 <210> 33
 < 211> 13
 < 212> PRT
 40 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 33
 Phe Gln Glu Tyr Thr Gly Thr Tyr Asp Ile Met Asp Pro
 1 5 10
 45 <210> 34
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 50 < 223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 34
 Phe Gln Ala Val Glu Ala Ser Lys Thr Leu His Phe Trp
 1 5 10
 <210> 35
 < 211> 13
 55 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> synthetic sequence: Obtained from a phage display library

<400> 35
Tyr Leu Glu Thr Ser Arg Thr Tyr Thr Thr Val Trp Pro
1 5 10
 <210> 36
 < 211> 13
 5 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 36
Thr Asp Tyr Leu Glu Val Arg Ser Gln Pro Ile Ile Tyr
1 5 10
 <210> 37
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 15 <220>
 < 223> synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 37
Thr Phe Glu Gln Glu Val Arg Ala Pro Asn Ile Ser Trp
1 5 10
 <210> 38
 20 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 25 <400> 38
Pro Gln Glu Val Gln Gly Ile Ala Val Glu Trp Val
1 5 10
 <210> 39
 < 211> 13
 < 212> PRT
 30 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 39
Ala Glu Ala Lys Ala Ser Thr Leu His Val Tyr Leu Met
1 5 10
 35 <210> 40
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 40 < 223> Synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 40
Asp Tyr Met Glu Val Val Gly Asn Lys Ile Ser Tyr Ile
1 5 10
 45 <210> 41
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 50 < 223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 41
Val Ile Met Glu Ala Val Gly Arg Lys Thr Ile Leu Gln
1 5 10
 <210> 42
 < 211> 13
 55 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 42

Phe Gln Ala Glu Ala Ala Arg Ala Val Thr Tyr Ser Ser
1 5 10
 <210> 43
 <211> 13
 <212> PRT
 5 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 43
Glu Asp Tyr Val Tyr Val Lys Asp Val Gly Thr Thr Asn
1 5 10
 10 <210> 44
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 15 <223> Synthetic sequence : obtained from a phage display library
 <400> 44
Gln Glu Tyr Lys Ala His His Ser Tyr Lys Leu Met Ser
1 5 10
 <210> 45
 <211> 13
 20 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 45
Tyr Asn Glu Tyr Arg Ala Thr Pro Thr Phe Ala Val Val
1 5 10
 25 <210> 46
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 30 <220>
 <223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 46
Glu Tyr Phe His Ala Asn Thr Thr Arg Ile Val Gln Ser
1 5 10
 35 <210> 47
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 47
Ala Leu Glu Ala Ser Arg Phe Ile Ser Trp Asp Ile Asn
1 5 10
 40 <210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 45 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 48
Trp Glu Ala Val Ala Ala Pro Ile Met His Thr Trp Val
1 5 10
 50 <210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 55 <223> synthetic sequence: obtained from a phage display library
 <400> 49
Phe Gln Glu Leu Lys Ala Ala Glu Thr Phe Trp Met
1 5 10

<210> 50
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 5 <220>
 < 223> synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 50
 Asn Thr Leu Tyr Ala Val Ala Pro Pro Val Ile Tyr Val
 1 5 10
 <210> 51
 10 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 15 <400> 51
 Phe Gln Pro Tyr Glu Val Gln Arg Ile Thr Thr Val Met
 1 5 10
 <210> 52
 < 211> 13
 < 212> PRT
 20 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 52
 Lys Pro Met Glu Ser Gly Arg Arg Thr Thr Val Tyr Tyr
 1 5 10
 25 <210> 53
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 30 < 223> Synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 53
 Met Glu Phe Lys Gly Ala Leu Gln Tyr Arg Leu Gln Pro
 1 5 10
 <210> 54
 < 211> 13
 35 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 54
 Pro Gln Glu Val Lys Gln Ala Arg Lys Trp Ile Ile Glu
 1 5 10
 40 <210> 55
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 45 <220>
 < 223> Synthetic sequence: Obtained from a phage display library
 <400> 55
 Tyr Arg Gln Gln Glu Val Lys Arg His Ile Gln Ile Val
 1 5 10
 50 <210> 56
 < 211> 9
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 55 < 223> Synthetic sequence: Consensus ADAMTS-4 cleavage motif
 <220>
 < 221> VARIANT
 < 222> (2)..(2)
 < 223> xaa is Ala, Phe, Val, Leu, Met, or Tyr
 <220>

< 221> VARIANT
 < 222> (3)..(3)
 < 223> May be present or absent. If present, xaa indicates no obvious consensus
 <220>
 5 < 221> VARIANT
 < 222> (4)..(4)
 < 223> Xaa is Arg or Lys
 <220>
 10 < 221> VARIANT
 < 222> (5)..(7)
 < 223> Any 1 xaa may be present or absent: represents a range of 2-3 amino acids. If present, xaa indicates no obvious consensus
 <220>
 15 < 221> VARIANT
 < 222> (8) .. (8)
 < 223> Xaa is Ser or Thr
 <220>
 20 < 221> VARIANT
 < 222> (9)..(9)
 < 223> Xaa is val, Tyr, Ile, Phe, Trp, Met, Leu, or Ala
 <400> 56
~~Glu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa~~
 1 5
 <210> 57
 < 211> 5
 25 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: Linker
 <400> 57
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 30 <210> 58
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> Artificial sequence
 35 <220>
 < 223> synthetic sequence: Linker
 <400> 58
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 59
 40 < 211> 1363
 < 212> DNA
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 < 223> Synthetic sequence: Aggrecanase construct with 806 cleavage site
 45 <220>
 < 221> CDS
 < 222> (1)..(1362)
 <400> 59

atg ccg ccc tcc ggg ctg cgg ctg ctg ccg ctg ctg cta ccg ctg ctg Met Pro Pro Ser Gly Leu Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu 1 5 10 15	48
tgg cta ctg gtg ctg acg cct ggc ccg ccg gcc gcg gga cta tcc acc Trp Leu Leu Val Leu Thr Pro Gly Pro Pro Ala Ala Gly Leu Ser Thr 20 25 30	96
tgc aag act atc gac atg gag ctg gtg aag cgg aag cgc atc gag gcc Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Val Lys Arg Lys Arg Ile Glu Ala 35 40 45	144
atc cgc ggc cag atc ctg tcc aag ctg cgg ctc gcc agc ccc ccg agc Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser Pro Pro Ser 50 55 60	192
cag ggg gag gtg ccg ccc ggc ccg ctg ccc gag gcc gtg ctc gcc ctg Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val Leu Ala Leu 65 70 75 80	240
tac aac agc acc cgc gac cgg gtg gcc ggg gag agt gca gaa ccg gag Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala Glu Pro Glu 85 90 95	288
ccc gag cct gag gcc gac tac tac gcc aag gag gtc acc cgc gtg cta Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr Arg Val Leu 100 105 110	336
atg gtg gaa acc cac aac gaa atc tat gac aag ttc aag cag agt aca Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys Gln Ser Thr 115 120 125	384
cac agc ata tat atg ttc ttc aac aca tca gag ctc cga gaa gcg gta His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg Glu Ala Val 130 135 140	432
cct gaa ccc gtg ttg ctc tcc cgg gca gag ctg cgt ctg ctg agg agg Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu Leu Arg Arg 145 150 155 160	480

ctc aag tta aaa gtg gag cag cac gtg gag ctg tac cag aaa tac agc Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys Tyr Ser 165 170 175	528
aac aat tcc tgg cga tac ctc agc aac cgg ctg ctg gca ccc agc gac Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp 180 185 190	576
tcg cca gag tgg tta tct ttt gat gtc acc gga gtt gtg cgg cag tgg Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg Gln Trp 195 200 205	624
ttg agc cgt gga ggg gaa att gag ggc ttt cgc ctt agc gcc cac tgc Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala His Cys 210 215 220	672
tcc tgt gac agc agg gat aac aca ctg caa gtg gac atc aac ggg ttc Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn Gly Phe 225 230 235 240	720
act acc ggc cgc cga ggt gac ctg gcc acc att cat ggc atg aac cgg Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met Asn Arg 245 250 255	768
cct ttc ctg ctt ctc atg gcc acc ccg ctg gag agg gcc cag cat ctg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln His Leu 260 265 270	816
caa agc gaa ttc gga ggc ggg ggt tca gac gtc caa gaa ttc cgc ggc Gln Ser Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Glu Phe Arg Gly 275 280 285	864
gtc aca gct gtg atc cgt gga ggc ggg ggt tca gcg gcc gca cat atc Val Thr Ala Val Ile Arg Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala His Ile 290 295 300	912
cac gga tgc gac aaa aat cac ttg aga gag atc atc ggc att ttg aac His Gly Cys Asp Lys Asn His Leu Arg Glu Ile Ile Gly Ile Leu Asn 305 310 315 320	960
gag gtc aca gga gaa ggg acg cca tgc acg gag atg gat gtg cca aac Glu Val Thr Gly Glu Gly Thr Pro Cys Thr Glu Met Asp Val Pro Asn 325 330 335	1008
gtc ctc aca gca acg aag aac acc aca gag agt gag ctc gtc tgt agg Val Leu Thr Ala Thr Lys Asn Thr Thr Glu Ser Glu Leu Val Cys Arg 340 345 350	1056
gct tcc aag gtg ctt cgc ata ttt tat tta aaa cat ggg aaa act cca Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Phe Tyr Leu Lys His Gly Lys Thr Pro 355 360 365	1104
tgc ttg aag aag aac tct agt gtt ctc atg gag ctg cag aga ctc ttt Cys Leu Lys Lys Asn Ser Ser Val Leu Met Glu Leu Gln Arg Leu Phe 370 375 380	1152
cgg gct ttt cga tgc ctg gat tca tcg ata agc tgc acc atg aat gag Arg Ala Phe Arg Cys Leu Asp Ser Ser Ile Ser Cys Thr Met Asn Glu 385 390 395 400	1200
tcc aag tcc aca tca ctg aaa gac ttt ctg gaa agc cta aag agc atc Ser Lys Ser Thr Ser Leu Lys Asp Phe Leu Glu Ser Leu Lys Ser Ile 405 410 415	1248
atg caa atg gat tac tcg cac cat cac cac cac cca ttg agg gcc cta Met Gln Met Asp Tyr Ser His His His His Pro Leu Arg Ala Leu 420 425 430	1296
ttc tat agt gtc acc taa atg cta gag ctc gct gat cag cct cga ctg Phe Tyr Ser Val Thr Met Leu Glu Leu Ala Asp Gln Pro Arg Leu 435 440 445	1344
tgc ctt cta gtt gcc agc c Cys Leu Leu Val Ala Ser 450	1363

<210> 60

<211> 437

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> synthetic sequence: Aggrecanase construct with B06 cleavage site

5

<400> 60

```

Met Pro Pro Ser Gly Leu Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 1          5          10          15

Trp Leu Leu Val Leu Thr Pro Gly Pro Pro Ala Ala Gly Leu Ser Thr
 20          25          30

Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg Ile Glu Ala
 35          40          45

Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser Pro Pro Ser
 50          55          60

Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val Leu Ala Leu
 65          70          75          80

Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala Glu Pro Glu
 85          90          95

Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr Arg Val Leu
100          105          110

Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys Gln Ser Thr
115          120          125

His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg Glu Ala Val
130          135          140

Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu Leu Arg Arg
145          150          155          160

Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys Tyr Ser
165          170          175

Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp
180          185          190

Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg Gln Trp

```

ES 2 552 018 T3

195	200	205
Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile	Glu Gly Phe Arg	Leu Ser Ala His Cys
210	215	220
Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val	Asp Ile Asn Gly Phe	
225	230	235
Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met Asn Arg		
	245	250
Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln His Leu		
	260	265
Gln Ser Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Glu Phe Arg Gly		
	275	280
Val Thr Ala Val Ile Arg Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala His Ile		
	290	295
His Gly Cys Asp Lys Asn His Leu Arg Glu Ile Ile Gly Ile Leu Asn		
305	310	315
Glu Val Thr Gly Glu Gly Thr Pro Cys Thr Glu Met Asp Val Pro Asn		
	325	330
Val Leu Thr Ala Thr Lys Asn Thr Thr Glu Ser Glu Leu Val Cys Arg		
	340	345
Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Phe Tyr Leu Lys His Gly Lys Thr Pro		
	355	360
Cys Leu Lys Lys Asn Ser Ser Val Leu Met Glu Leu Gln Arg Leu Phe		
	370	375
Arg Ala Phe Arg Cys Leu Asp Ser Ser Ile Ser Cys Thr Met Asn Glu		
385	390	395
Ser Lys Ser Thr Ser Leu Lys Asp Phe Leu Glu Ser Leu Lys Ser Ile		
	405	410
Met Gln Met Asp Tyr Ser His His His His His Pro Leu Arg Ala Leu		
	420	425

Phe Tyr Ser Val Thr
435

<210> 61

< 211> 16

< 212> PRT

5 < 213> Artificial sequence

<220>

< 223> synthetic Construct

<400> 61

Met Leu Glu Leu Ala Asp Gln Pro Arg Leu Cys Leu Leu Val Ala Ser
1 5 10 15

10 <210> 62

< 211> 1314

< 212> DNA

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Synthetic sequence: AggreCANase construct with B05 cleavage site

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(1314)

5

<400> 62

atg ccg ccc tcc ggg ctg cgg ctg ctg ccg ctg ctg cta ccg ctg ctg	48
Met Pro Pro Ser Gly Leu Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu	
1 5 10 15	
tgg cta ctg gtg ctg acg cct ggc ccg ccg gcc gcg gga cta tcc acc	96
Trp Leu Leu Val Leu Thr Pro Gly Pro Pro Ala Ala Gly Leu Ser Thr	
20 25 30	
tgc aag act atc gac atg gag ctg gtg aag ccg aag cgc atc gag gcc	144
Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg Ile Glu Ala	
35 40 45	
atc cgc ggc cag atc ctg tcc aag ctg ccg ctc gcc agc ccc ccg agc	192
Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser Pro Pro Ser	
50 55 60	
cag ggg gag gtg ccg ccc ggc ccg ctg ccc gag gcc gtg ctc gcc ctg	240
Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val Leu Ala Leu	
65 70 75 80	
tac aac agc acc cgc gac cgg gtg gcc ggg gag agt gca gaa ccg gag	288
Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala Glu Pro Glu	
85 90 95	
ccc gag cct gag gcc gac tac tac gcc aag gag gtc acc cgc gtg cta	336
Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr Arg Val Leu	
100 105 110	
atg gtg gaa acc cac aac gaa atc tat gac aag ttc aag cag agt aca	384
Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys Gln Ser Thr	
115 120 125	
cac agc ata tat atg ttc ttc aac aca tca gag ctc cga gaa gcg gta	432
His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg Glu Ala Val	
130 135 140	
cct gaa ccc gtg ttg ctc tcc cgg gca gag ctg cgt ctg ctg agg agg	480
Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu Leu Arg Arg	
145 150 155 160	
ctc aag tta aaa gtg gag cag cac gtg gag ctg tac cag aaa tac agc	528
Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys Tyr Ser	
165 170 175	
aac aat tcc tgg cga tac ctc agc aac ccg ctg ctg gca ccc agc gac	576
Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp	

180	185	190	
tgc cca gag tgg tta tct ttt gat gtc acc gga gtt gtg cgg cag tgg Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg Gln Trp			624
195	200	205	
ttg agc cgt gga ggg gaa att gag ggc ttt cgc ctt agc gcc cac tgc Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala His Cys			672
210	215	220	
tcc tgt gac agc agg gat aac aca ctg caa gtg gac atc aac ggg ttc Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn Gly Phe			720
225	230	235	
act acc ggc cgc cga ggt gac ctg gcc acc att cat ggc atg aac cgg Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met Asn Arg			768
245	250	255	
cct ttc ctg ctt ctc atg gcc acc ccg ctg gag agg gcc cag cat ctg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln His Leu			816
260	265	270	
caa agc gaa ttc gga ggc ggg gga tcc cac aac gag ttc cga cag cgg Gln Ser Glu Phe Gly Gly Gly Glu Ser His Asn Glu Phe Arg Gln Arg			864
275	280	285	
gag aca tat atg gtc ttc gga ggc ggg ggt tca gcg gcc gca cat atc Glu Thr Tyr Met Val Phe Glu Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala His Ile			912
290	295	300	
cac gga tgc gac aaa aat cac ttg aga gag atc atc ggc att ttg aac His Gly Cys Asp Lys Asn His Leu Arg Glu Ile Ile Gly Ile Leu Asn			960
305	310	315	
gag gtc aca gga gaa ggg acg cca tgc acg gag atg gat gtg cca aac Glu Val Thr Gly Glu Gly Thr Pro Cys Thr Glu Met Asp Val Pro Asn			1008
325	330	335	
gtc ctc aca gca acg aag aac acc aca gag agt gag ctc gtc tgt agg Val Leu Thr Ala Thr Lys Asn Thr Thr Glu Ser Glu Leu Val Cys Arg			1056
340	345	350	
gct tcc aag gtg ctt cgc ata ttt tat tta aaa cat ggg aaa act cca Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Phe Tyr Leu Lys His Gly Lys Thr Pro			1104
355	360	365	
tgc ttg aag aag aac tct agt gtt ctc atg gag ctg cag aga ctc ttt Cys Leu Lys Lys Asn Ser Ser Val Leu Met Glu Leu Gln Arg Leu Phe			1152
370	375	380	
cgg gct ttt cga tgc ctg gat tca tcg ata agc tgc acc atg aat gag Arg Ala Phe Arg Cys Leu Asp Ser Ser Ile Ser Cys Thr Met Asn Glu			1200
385	390	395	400
tcc aag tcc aca tca ctg aaa gac ttt ctg gaa agc cta aag agc atc Ser Lys Ser Thr Ser Leu Lys Asp Phe Leu Glu Ser Leu Lys Ser Ile			1248
405	410	415	
atg caa atg gat tac tcg cac cat cac cac cac cca ttg agg gcc cta Met Gln Met Asp Tyr Ser His His His His Pro Leu Arg Ala Leu			1296
420	425	430	
ttc tat agt gtc acc taa Phe Tyr Ser Val Thr			1314
435			

<210> 63

< 211> 437

< 212> PRT

< 213> Artificial sequence

<220>

< 223> Synthetic sequence: Aggrecanase construct with B05 cleavage site

<400> 63

Met Pro Pro Ser Gly Leu Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Trp Leu Leu Val Leu Thr Pro Gly Pro Pro Ala Ala Gly Leu Ser Thr
20 25 30

Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg Ile Glu Ala
35 40 45

Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser Pro Pro Ser
50 55 60

Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val Leu Ala Leu
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala Glu Pro Glu
85 90 95

Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr Arg Val Leu
100 105 110

Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys Gln Ser Thr
115 120 125

His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg Glu Ala Val
130 135 140

Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu Leu Arg Arg
145 150 155 160

Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys Tyr Ser
165 170 175

Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp
180 185 190

Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg Gln Trp
195 200 205

Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala His Cys
210 215 220

Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn Gly Phe
225 230 235 240

Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met Asn Arg
245 250 255
Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln His Leu
260 265 270
Gln Ser Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser His Asn Glu Phe Arg Gln Arg
275 280 285
Glu Thr Tyr Met val Phe Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala His Ile
290 295 300
His Gly Cys Asp Lys Asn His Leu Arg Glu Ile Ile Gly Ile Leu Asn
305 310 315 320
Glu Val Thr Gly Glu Gly Thr Pro Cys Thr Glu Met Asp Val Pro Asn
325 330 335
Val Leu Thr Ala Thr Lys Asn Thr Thr Glu Ser Glu Leu Val Cys Arg
340 345 350
Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Phe Tyr Leu Lys His Gly Lys Thr Pro
355 360 365
Cys Leu Lys Lys Asn Ser Ser Val Leu Met Glu Leu Gln Arg Leu Phe
370 375 380
Arg Ala Phe Arg Cys Leu Asp Ser Ser Ile Ser Cys Thr Met Asn Glu
385 390 395 400
Ser Lys Ser Thr Ser Leu Lys Asp Phe Leu Glu Ser Leu Lys Ser Ile
405 410 415
Met Gln Met Asp Tyr Ser His His His His Pro Leu Arg Ala Leu
420 425 430

Phe Tyr Ser Val Thr
435

<210> 64

< 211> 76

< 212> DNA

5 < 213> Artificial sequence

<220>

< 223> synthetic sequence: Oligonucleotide

<400> 64

aattcggagg cggggggttca gacgtccaag aattccgcgg cgtcacagct gtgatccgtg 60

gaggcggggg ttcagc 76

10 <210> 65

< 211> 76

< 212> DNA

< 213> Artificial sequence

<220>

15 < 223> Synthetic sequence: oligonucleotide

<400> 65

ggccgctgaa ccccgccctc cacggatcac agctgtgacg ccgcggaatt cttggacgtc 60

tgaacccccg cctccg 76

<210> 66

< 211> 76

20 < 212> DNA

< 213> Artificial sequence

<220>
 < 223> Synthetic sequence: oligonucleotide
 <400> 66
 aattcggagg cgggggatcc cacaacgagt tccgacagcg ggagacatat atgggtcttcg 60
 gaggcggggg ttcagc 76
 5 <210> 67
 < 211> 76
 < 212> DNA
 < 213> Artificial sequence
 <220>
 10 < 223> synthetic sequence: oligonucleotide
 <400> 67
 ggccgctgaa ccccccgcctc cgaagaccat atatgtctcc cgctgtcgga actcgttgtg 60
 ggatcccccg cctccg 76
 15

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende un péptido asociado a la latencia (LAP) que es el dominio precursor de TGFβ-1, -2, -3, -4 o -5 y un principio farmacéuticamente activo en el que el LAP y el principio farmacéuticamente activo están unidos por una secuencia de aminoácidos que comprende un sitio de escisión proteolítica por una agrecanasa escindido por ADAMTS-4 (agrecanasa-1) o ADAMTS-5 (agrecanasa-2).
2. Una proteína de fusión como la reivindicada en la reivindicación 1, en la que el sitio de escisión por una agrecanasa es escindido por ADAMTS-4 (agrecanasa-1) y es definido por la secuencia de consenso E-[AFVLMY]-X_(0,1)-[RK]-X_(2,3)-[ST]-[VYIFWMLA].
3. Una proteína de fusión como la reivindicada en la reivindicación 2, en la que el sitio de escisión por una agrecanasa es:
HNEFRQRETYMVF, o
DVQEFRGVTAVIR
4. Una proteína de fusión como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la secuencia peptídica conectora está presente adyacente al sitio de escisión por una agrecanasa.
5. Una proteína de fusión como la reivindicada en la reivindicación 4, en la que la secuencia conectora peptídica es GGGGS, o un múltiplo de ésta.
6. Una proteína de fusión como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el principio farmacéuticamente activo es una proteína.
7. Una proteína de fusión como la reivindicada en la reivindicación 6, en la que la proteína farmacéuticamente activa es un factor de crecimiento, un factor de diferenciación, una citocina, una quimiocina, un factor trófico, un inhibidor de las citocinas, un receptor de citocinas, una enzima secuestradora de radicales libres, una enzima convertidora de profármacos, un peptidomimético, un inhibidor de las proteasas, un inhibidor tisular de las metaloproteinasas o un inhibidor de la serina proteasa.
8. Una proteína de fusión como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la proteína de fusión está en asociación con una proteína de unión a TGFβ latente.
9. Una proteína de fusión que consiste en un LAP que es el dominio precursor de TGFβ-1, -2, -3, -4 o -5 y un sitio de escisión proteolítica por una agrecanasa donde la proteína de fusión está asociada con un principio farmacéuticamente activo, en la cual el sitio de escisión por una agrecanasa es escindido por ADAMTS-4 (agrecanasa-1), ADAMTS-5 (agrecanasa-2).
10. Un constructo de ácido nucleico que contiene una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un principio farmacéuticamente activo, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un LAP que es el dominio precursor de TGFβ-1, -2, -3, -4 o -5, donde la secuencia de ácido nucleico que codifica un sitio de escisión proteolítica por una agrecanasa se provee entre la primera y la segunda secuencias de ácido nucleico, donde el sitio de escisión por una agrecanasa es escindido por ADAMTS-4 (agrecanasa-1), ADAMTS-5 (agrecanasa-2).
11. Un constructo de ácido nucleico como el reivindicado en la reivindicación 10, en el que el principio farmacéuticamente activo es un factor de crecimiento, un factor de diferenciación, una citocina, una quimiocina, un factor trófico, un inhibidor de las citocinas, un receptor de citocinas, una enzima secuestradora de radicales libres, una enzima convertidora de profármacos, un peptidomimético, un inhibidor de las proteasas, un inhibidor tisular de las metaloproteinasas o un inhibidor de la serina proteasa.
12. Un vector que contiene un constructo de ácido nucleico de la reivindicación 10 o la reivindicación 11.
13. Una proteína de fusión codificada por el constructo de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.
14. Una célula que contiene un vector de la reivindicación 12 o el constructo de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11.
15. Una proteína de fusión como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, una secuencia de ácido nucleico como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, o una célula como la reivindicada en la reivindicación 14 para usar en el tratamiento de artritis o cáncer.

16. Una composición farmacéutica que contiene una proteína de fusión como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, un constructo de ácido nucleico como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, o una célula como la reivindicada en la reivindicación 14.
- 5 17. El uso de una proteína de fusión como la definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, una secuencia de ácido nucleico como la definida en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 o una célula como la definida en la reivindicación 14 en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de artritis o cáncer.
- 10 18. Un kit de piezas que contiene una proteína de fusión como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o un constructo de ácido nucleico como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, o una célula como la reivindicada en la reivindicación 14 y un vehículo de administración.
- 15 19. Un proceso para preparar la proteína de fusión como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende la producción de la proteína de fusión por vía de recombinación mediante expresión en una célula huésped, la purificación de la proteína de fusión expresada y la asociación del principio farmacéuticamente activo con la proteína de fusión purificada por medio de una unión por enlace peptídico, enlace de hidrógeno o salino, o reticulación química.
- 20 20. Un proceso para preparar un constructo de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 que comprende ligar entre sí secuencias de ácido nucleico que codifican un péptido asociado a la latencia, una secuencia de escisión por una agrecanasa y un principio farmacéuticamente activo, que incluye opcionalmente una secuencia conectora a cada lado del sitio de escisión por una agrecanasa.

[illegible]

FIG. 1 CONT'D

Código del fago	Secuencia peptídica	% promedio escindido
D04	----MIF-KGQR-VERVLT	99.7
B05	---HNFT-KQKSTMMVF--	99.6
B07	--NWQEFQ-AKRSVAY---	99.5
D03	----LQL-EGN-SVDSTWT	99.4
C02	--DYMEV-RRQ-GRCH---	99.4
F03	---ALEM-RAAD-VEYEF-	99.3
D01	VERHMEVQKTI-IV-----	99.2
A05	---GVTV-GRQTSVRYM--	99.1
B08	----QELVGANIETMYL--	99.0
C06	--QOMVSRIY-QDQV---	98.9
F05	---LQSE-KQAP-VDIWW-	98.9
H04	----QEL-RGKISIQPFK-	98.9
E03	---QOMSGQYDRIIP---	98.8
D07	---SMEEA-ATVSTFE--	98.7
C07	---EQQL-KGROTHIII--	98.5
B02	----MEL-KGQ-TDMFYII	98.5
F01	---GATAV-GRWSYDA--	98.3
D01	---QQT-ISTKIDEEK---	98.2
B06	--DVDEF-RGV-TAVIR--	98.0
A05	----ELA-RIVSTIYMLL-	98.0
C04	---YMEN-ESTSTMEFN--	97.9
F06	----QLIGSY-SVMPIN--	97.9
E01	-HYMEATNDIEMV-----	97.9
A06	----NEHSSGITMLR--	97.8
H01	-DEPMEE-RSKITIK-----	97.8
A01	--TFNEL-KCTVSYAL---	97.7
F04	-GVHESMREY-TMI-----	97.7
E05	---FDYTG---TDIMDP	97.6
A04	-FOAVEARK-TLRFN-----	97.6
D02	---YLETSTIY-TIVNP--	97.5
F08	-TDYLEV-RSQPIHY-----	97.2
D03	-TTEDEV-RAFN-IGN---	97.1
B04	---PDVQGIHAVNV-----	96.9
F10	----ADA-KAS-TDQVYIM	96.8
D09	--DYMEVVENKISYI-----	96.7
F09	--VIMEAV-GRKIDILQ---	96.5
D10	--FOAEARAV-TYSS---	96.5
F07	-EDYVIV-KOVGTIN-----	96.4
A00	---QDY-DAHDSVGLASD	96.2
C03	---YNDY-RATPTDAVV--	95.8
H03	-----EMPHANTDRIVQS-	95.4
G02	---ALEASFI-SWDIN--	95.3
C01	----REVAAD--DQITWV	94.3
E02	---FDEL-KAETENMI---	94.1
F02	--NTLEAV-APPVHYV---	90.4
G01	-FQPYEVQKIT-TM-----	89.9
A02	--IFMGGERT-TYYI---	88.5
G05	----MEF-KGALQMLQP-	82.9
H02	---PDV-KQARKIIE---	79.4
A07	-YRQDSVKEHIQIV-----	34.2

E-[AFVLMY]-X(0,1)-[RK]-X(2,3)-[ST]-[VYIFWMLA]

FIG. 2

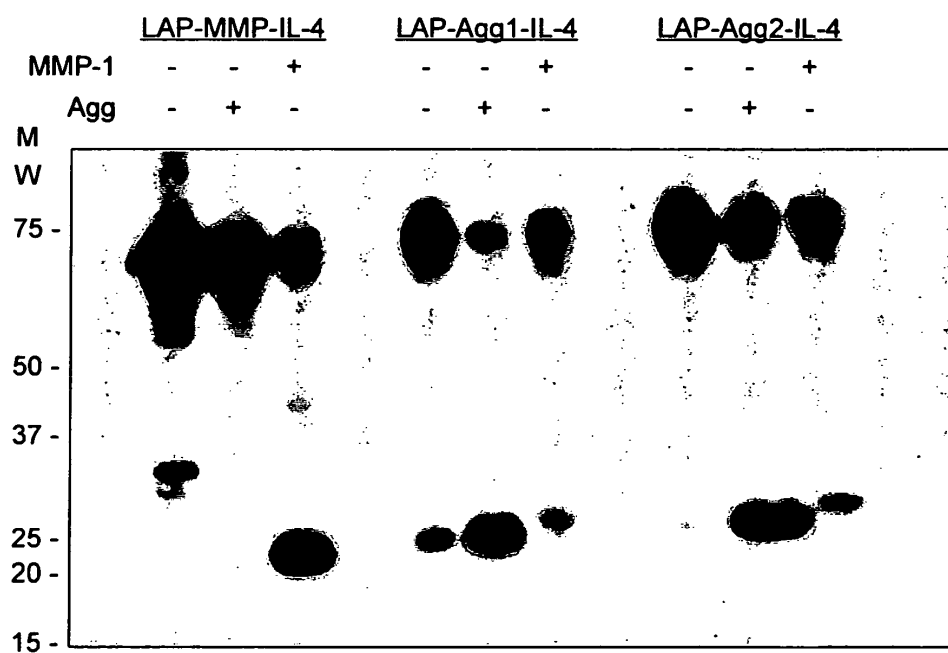


FIG. 3

FIG. 4

```

5'  ATG  CCG  CCC  TCC  GGG  CTG  CCG  CTG  CTG  CCG  CTG  CTG  CTA  CCG  CTG  CTG  TGG  CTA
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
    Met  Pro  Pro  Ser  Gly  Leu  Arg  Leu  Leu  Pro  Leu  Leu  Leu  Pro  Leu  Leu  Trp  Leu

      9      18      27      36      45      54
CTG  GTG  CTG  ACG  CCT  GGC  CCG  CCG  GCC  GCG  GGA  CTA  TCC  ACC  TGC  AAG  ACT  ATC
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
Leu  Val  Leu  Thr  Pro  Gly  Pro  Pro  Ala  Ala  Gly  Leu  Ser  Thr  Cys  Lys  Thr  Ile

    117      126      135      144      153      162
GAC  ATG  GAG  CTG  GTG  AAG  CCG  AAG  CGC  ATC  GAG  GCC  ATC  CGC  GGC  CAG  ATC  CTG
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
Asp  Met  Glu  Leu  Val  Lys  Arg  Lys  Arg  Ile  Glu  Ala  Ile  Arg  Gly  Gln  Ile  Leu

    171      180      189      198      207      216
TCC  AAG  CTG  CCG  CTC  GCC  AGC  CCC  CCG  AGC  CAG  GGG  GAG  GTG  CCG  CCC  GGC  CCG
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
Ser  Lys  Leu  Arg  Leu  Ala  Ser  Pro  Pro  Ser  Gln  Gly  Glu  Val  Pro  Pro  Gly  Pro

    225      234      243      252      261      270
CTG  CCC  GAG  GCC  GTG  CTC  GCC  CTG  TAC  AAC  AGC  ACC  CGC  GAC  CGG  GTG  GCC  GGG
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
Leu  Pro  Glu  Ala  Val  Leu  Ala  Leu  Tyr  Asn  Ser  Thr  Arg  Asp  Arg  Val  Ala  Gly

    279      288      297      306      315      324
GAG  AGT  GCA  GAA  CCG  GAG  CCC  GAG  CCT  GAG  GCC  GAC  TAC  TAC  GCC  AAG  GAG  GTC
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
Glu  Ser  Ala  Glu  Pro  Glu  Pro  Glu  Pro  Glu  Ala  Asp  Tyr  Tyr  Ala  Lys  Glu  Val

    333      342      351      360      369      378
ACC  CGC  GTG  CTA  ATG  GTG  GAA  ACC  CAC  AAC  GAA  ATC  TAT  GAC  AAG  TTC  AAG  CAG
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
Thr  Arg  Val  Leu  Met  Val  Glu  Thr  His  Asn  Glu  Ile  Tyr  Asp  Lys  Phe  Lys  Gln

    387      396      405      414      423      432
AGT  ACA  CAC  AGC  ATA  TAT  ATG  TTC  TTC  AAC  ACA  TCA  GAG  CTC  CGA  GAA  GCG  GTA
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
Ser  Thr  His  Ser  Ile  Tyr  Met  Phe  Phe  Asn  Thr  Ser  Glu  Leu  Arg  Glu  Ala  Val

    441      450      459      468      477      486
CCT  GAA  CCC  GTG  TTG  CTC  TCC  CGG  GCA  GAG  CTG  CGT  CTG  CTG  AGG  AGG  CTC  AAG
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
Pro  Glu  Pro  Val  Leu  Leu  Ser  Arg  Ala  Glu  Leu  Arg  Leu  Leu  Arg  Arg  Leu  Lys

    495      504      513      522      531      540
TTA  AAA  GTG  GAG  CAG  CAC  GTG  GAG  CTG  TAC  CAG  AAA  TAC  AGC  AAC  AAT  TCC  TGG
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
Leu  Lys  Val  Glu  Gln  His  Val  Glu  Leu  Tyr  Gln  Lys  Tyr  Ser  Asn  Asn  Ser  Trp

    549      558      567      576      585      594
CGA  TAC  CTC  AGC  AAC  CGG  CTG  CTG  GCA  CCC  AGC  GAC  TCG  CCA  GAG  TGG  TTA  TCT
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
Arg  Tyr  Leu  Ser  Asn  Arg  Leu  Leu  Ala  Pro  Ser  Asp  Ser  Pro  Glu  Trp  Leu  Ser

    603      612      621      630      639      648
TTT  GAT  GTC  ACC  GGA  GTT  GTG  CGG  CAG  TGG  TTG  AGC  CGT  GGA  GGG  GAA  ATT  GAG
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
Phe  Asp  Val  Thr  Gly  Val  Val  Arg  Gln  Trp  Leu  Ser  Arg  Gly  Gly  Glu  Ile  Glu

    657      666      675      684      693      702
GGC  TTT  CGC  CTT  AGC  GCC  CAC  TGC  TCC  TGT  GAC  AGC  AGG  GAT  AAC  ACA  CTG  CAA
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
Gly  Phe  Arg  Leu  Ser  Ala  His  Cys  Ser  Cys  Asp  Ser  Arg  Asp  Asn  Thr  Leu  Gln

```

711	720	729	738	747	756
GTG GAC ATC AAC GGG TTC ACT ACC GGC CGC CGA GGT GAC CTG GCC ACC ATT CAT					
Val Asp Ile Asn Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His					
765	774	783	792	801	810
GGC ATG AAC CGG CCT TTC CTG CTT CTC ATG GCC ACC CCG CTG GAG AGG GCC CAG					
Gly Met Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln					
819	828	837	846	855	864
CAT CTG CAA AGC <u>GAA TTC</u> GGA GGC GGG GGT TCA GAC GTC CAA GAA TTC CGC GGC					
His Leu Gln Ser Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Glu Phe Arg Gly					
873	882	891	900	909	918
GTC ACA GCT GTG ATC CGT GGA GGC GGG GGT TCA <u>GCG GCC GCA</u> CAT ATC CAC GGA					
Val Thr Ala Val Ile Arg Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala His Ile His Gly					
927	936	945	954	963	972
TGC GAC AAA AAT CAC TTG AGA GAG ATC ATC GGC ATT TTG AAC GAG GTC ACA GGA					
Cys Asp Lys Asn His Leu Arg Glu Ile Ile Gly Ile Leu Asn Glu Val Thr Gly					
981	990	999	1008	1017	1026
GAA GGG ACG CCA TGC ACG GAG ATG GAT GTG CCA AAC GTC CTC ACA GCA ACG AAG					
Glu Gly Thr Pro Cys Thr Glu Met Asp Val Pro Asn Val Leu Thr Ala Thr Lys					
1035	1044	1053	1062	1071	1080
AAC ACC ACA GAG AGT GAG CTC GTC TGT AGG GCT TCC AAG GTG CTT CGC ATA TTT					
Asn Thr Thr Glu Ser Glu Leu Val Cys Arg Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Phe					
1089	1098	1107	1116	1125	1134
TAT TTA AAA CAT GGG AAA ACT CCA TGC TTG AAG AAG AAC TCT AGT GTT CTC ATG					
Tyr Leu Lys His Gly Lys Thr Pro Cys Leu Lys Lys Asn Ser Ser Val Leu Met					
1143	1152	1161	1170	1179	1188
GAG CTG CAG AGA CTC TTT CGG GCT TTT CGA TGC CTG GAT TCA TCG ATA AGC TGC					
Glu Leu Gln Arg Leu Phe Arg Ala Phe Arg Cys Leu Asp Ser Ser Ile Ser Cys					
1197	1206	1215	1224	1233	1242
ACC ATG AAT GAG TCC AAG TCC ACA TCA CTG AAA GAC TTT CTG GAA AGC CTA AAG					
Thr Met Asn Glu Ser Lys Ser Thr Ser Leu Lys Asp Phe Leu Glu Ser Leu Lys					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
AGC ATC ATG CAA ATG GAT TAC TCG CAC CAT CAC CAC CAC CCA TTG AGG GCC CTA					
Ser Ile Met Gln Met Asp Tyr Ser His His His His His Pro Leu Arg Ala Leu					
1305	1314	1323	1332	1341	1350
TTC TAT AGT GTC ACC TAA ATG CTA GAG CTC GCT GAT CAG CCT CGA CTG TGC CTT					
Phe Tyr Ser Val Thr *** Met Leu Glu Leu Ala Asp Gln Pro Arg Leu Cys Leu					
1359					
CTA GTT GCC AGC C 3'					
Leu Val Ala Ser					

FIG. 4 CONT'D

FIG. 5

5'	ATG	CCG	CCC	TCC	GGG	CTG	CGG	CTG	CTG	CCG	CTG	CTG	CTA	CCG	CTG	CTG	TGG	CTA
	Met	Pro	Pro	Ser	Gly	Leu	Arg	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Trp	Leu
	CTG	GTG	CTG	ACG	CCT	GGC	CCG	CCG	GCC	GCG	GGA	CTA	TCC	ACC	TGC	AAG	ACT	ATC
	Leu	Val	Leu	Thr	Pro	Gly	Pro	Pro	Ala	Ala	Gly	Leu	Ser	Thr	Cys	Lys	Thr	Ile
	GAC	ATG	GAG	CTG	GTG	AAG	CGG	AAG	CGC	ATC	GAG	GCC	ATC	CGC	GGC	CAG	ATC	CTG
	Asp	Met	Glu	Leu	Val	Lys	Arg	Lys	Arg	Ile	Glu	Ala	Ile	Arg	Gly	Gln	Ile	Leu
	TCC	AAG	CTG	CGG	CTC	GCC	AGC	CCC	CCG	AGC	CAG	GGG	GAG	GTG	CCG	CCC	GGC	CCG
	Ser	Lys	Leu	Arg	Leu	Ala	Ser	Pro	Pro	Ser	Gln	Gly	Glu	Val	Pro	Pro	Gly	Pro
	CTG	CCC	GAG	GCC	GTG	CTC	GCC	CTG	TAC	AAC	AGC	ACC	CGC	GAC	CGG	GTG	GCC	GGG
	Leu	Pro	Glu	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Tyr	Asn	Ser	Thr	Arg	Asp	Arg	Val	Ala	Gly
	GAG	AGT	GCA	GAA	CCG	GAG	CCC	GAG	CCT	GAG	GCC	GAC	TAC	TAC	GCC	AAG	GAG	GTC
	Glu	Ser	Ala	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Glu	Val
	ACC	CGC	GTG	CTA	ATG	GTG	GAA	ACC	CAC	AAC	GAA	ATC	TAT	GAC	AAG	TTC	AAG	CAG
	Thr	Arg	Val	Leu	Met	Val	Glu	Thr	His	Asn	Glu	Ile	Tyr	Asp	Lys	Phe	Lys	Gln
	AGT	ACA	CAC	AGC	ATA	TAT	ATG	TTC	TTC	AAC	ACA	TCA	GAG	CTC	CGA	GAA	GCG	GTA
	Ser	Thr	His	Ser	Ile	Tyr	Met	Phe	Phe	Asn	Thr	Ser	Glu	Leu	Arg	Glu	Ala	Val
	CCT	GAA	CCC	GTG	TTG	CTC	TCC	CGG	GCA	GAG	CTG	CGT	CTG	CTG	AGG	AGG	CTC	AAG
	Pro	Glu	Pro	Val	Leu	Leu	Ser	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Lys
	TTA	AAA	GTG	GAG	CAG	CAC	GTG	GAG	CTG	TAC	CAG	AAA	TAC	AGC	AAC	AAT	TCC	TGG
	Leu	Lys	Val	Glu	Gln	His	Val	Glu	Leu	Tyr	Gln	Lys	Tyr	Ser	Asn	Asn	Ser	Trp
	CGA	TAC	CTC	AGC	AAC	CGG	CTG	CTG	GCA	CCC	AGC	GAC	TCG	CCA	GAG	TGG	TTA	TCT
	Arg	Tyr	Leu	Ser	Asn	Arg	Leu	Leu	Ala	Pro	Ser	Asp	Ser	Pro	Glu	Trp	Leu	Ser
	TTT	GAT	GTC	ACC	GGA	GTT	GTG	CGG	CAG	TGG	TTG	AGC	CGT	GGA	GGG	GAA	ATT	GAG
	Phe	Asp	Val	Thr	Gly	Val	Val	Arg	Gln	Trp	Leu	Ser	Arg	Gly	Gly	Glu	Ile	Glu
	GGC	TTT	CGC	CTT	AGC	GCC	CAC	TGC	TCC	TGT	GAC	AGC	AGG	GAT	AAC	ACA	CTG	CAA
	Gly	Phe	Arg	Leu	Ser	Ala	His	Cys	Ser	Cys	Asp	Ser	Arg	Asp	Asn	Thr	Leu	Gln

711	720	729	738	747	756
GTG GAC ATC AAC GGG TTC ACT ACC GGC CGC CGA GGT GAC CTG GCC ACC ATT CAT					
Val Asp Ile Asn Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His					
765	774	783	792	801	810
GGC ATG AAC CGG CCT TTC CTG CTT CTC ATG GCC ACC CCG CTG GAG AGG GCC CAG					
Gly Met Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln					
819	828	837	846	855	864
CAT CTG CAA AGC GAA TTC GGA GGC GGG GGA TCC CAC AAC GAG TTC CGA CAG CGG					
His Leu Gln Ser Glu Phe Gly Gly Gly Gly Ser His Asn Glu Phe Arg Gln Arg					
873	882	891	900	909	918
GAG ACA TAT ATG GTC TTC GGA GGC GGG GGT TCA GCG GCC GCA CAT ATC CAC GGA					
Glu Thr Tyr Met Val Phe Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala His Ile His Gly					
927	936	945	954	963	972
TGC GAC AAA AAT CAC TTG AGA GAG ATC ATC GGC ATT TTG AAC GAG GTC ACA GGA					
Cys Asp Lys Asn His Leu Arg Glu Ile Ile Gly Ile Leu Asn Glu Val Thr Gly					
981	990	999	1008	1017	1026
GAA GGG ACG CCA TGC ACG GAG ATG GAT GTG CCA AAC GTC CTC ACA GCA ACG AAG					
Glu Gly Thr Pro Cys Thr Glu Met Asp Val Pro Asn Val Leu Thr Ala Thr Lys					
1035	1044	1053	1062	1071	1080
AAC ACC ACA GAG AGT GAG CTC GTC TGT AGG GCT TCC AAG GTG CTT CGC ATA TTT					
Asn Thr Thr Glu Ser Glu Leu Val Cys Arg Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Phe					
1089	1098	1107	1116	1125	1134
TAT TTA AAA CAT GGG AAA ACT CCA TGC TTG AAG AAG AAC TCT AGT GTT CTC ATG					
Tyr Leu Lys His Gly Lys Thr Pro Cys Leu Lys Lys Asn Ser Ser Val Leu Met					
1143	1152	1161	1170	1179	1188
GAG CTG CAG AGA CTC TTT CGG GCT TTT CGA TGC CTG GAT TCA TCG ATA AGC TGC					
Glu Leu Gln Arg Leu Phe Arg Ala Phe Arg Cys Leu Asp Ser Ser Ile Ser Cys					
1197	1206	1215	1224	1233	1242
ACC ATG AAT GAG TCC AAG TCC ACA TCA CTG AAA GAC TTT CTG GAA AGC CTA AAG					
Thr Met Asn Glu Ser Lys Ser Thr Ser Leu Lys Asp Phe Leu Glu Ser Leu Lys					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
AGC ATC ATG CAA ATG GAT TAC TCG CAC CAT CAC CAC CAC CCA TTG AGG GCC CTA					
Ser Ile Met Gln Met Asp Tyr Ser His His His His His Pro Leu Arg Ala Leu					
1305	1314				
TTC TAT AGT GTC ACC TAA 3'					
Phe Tyr Ser Val Thr ***					

FIG. 5 CONT'D