

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 990**

51 Int. Cl.:

A61P 5/02 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2009 PCT/GB2009/050665**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2009 WO2009150469**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2009 E 09762018 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2310028**

54 Título: **Proteínas de fusión para uso en el tratamiento de acromegalia**

30 Prioridad:

12.06.2008 GB 0810785

12.06.2008 GB 0810782

14.11.2008 GB 0820884

17.11.2008 GB 0820965

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

02.06.2017

73 Titular/es:

IPSEN BIOINNOVATION LIMITED (100.0%)

Units 4-10 The Quadrant, Barton Lane

Abingdon Oxfordshire OX14 3YS, GB

72 Inventor/es:

JOHNSTONE, STEPHEN;

MARKS, PHILIP y

FOSTER, KEITH

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 614 990 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión para uso en el tratamiento de acromegalia

La presente invención describe agentes terapéuticos y las correspondientes terapias para el tratamiento de enfermedades y afecciones neuroendocrinas.

5 El sistema neuroendocrino está formado por células derivadas de la cresta neural embrionaria, el neuroectodermo y el endodermo. Se puede dividir en tipos celulares que forman glándulas y otros que están distribuidos de forma difusa, es decir el sistema neuroendocrino diseminado o difuso. El primer grupo incluye las células que forman la pituitaria, las glándulas paratiroides y la médula adrenal. El segundo grupo incluye células de la piel, pulmón, timo, tiroides, páncreas y los tractos de intestino grueso, biliar y urogenital. Los tumores neuroendocrinos puede surgir en
10 todas estas localizaciones y pueden provocar patofisiologías tanto por tamaño físico, que produzca una presión o constricción localizada en los órganos circundantes, como por secreciones anormales de una variedad de hormonas y otras moléculas bioactivas. Dichas moléculas normalmente son secretadas por células no tumorales en cantidades fisiológicamente apropiadas y bajo control fisiológico estricto. Sin embargo, cuando dichas células forman tumores, las secreciones pueden ser excesivas, dando lugar a enfermedades.

15 Las terapias actuales para estas enfermedades de hipersecreción pueden incluir la eliminación quirúrgica del tumor(es), quimioterapia anti-tumoral genérica, terapia de interferón, radioterapia y tratamientos más específicos, por ejemplo, con análogos de somatostatina. La preferencia para el modo de tratamiento inicial varía según el médico y, aunque cada una de dichas estrategias puede tener éxito, no siempre son apropiadas. Dependiendo del tamaño y la localización del tumor, la intervención quirúrgica puede ser considerada demasiado arriesgada y puede que el tumor
20 no se eliminado completamente. La terapia anti-tumoral, la terapia de interferón y la radioterapia a veces son mal toleradas por el paciente, o pueden estar contraindicadas por otras razones.

Adicionalmente, las terapias que resultan en la muerte de las células tumorales también introducen la posibilidad de que se produzca el síndrome de lisis tumoral (TLS, del inglés "Tumour Lysis Syndrome"). El TLS es una complicación muy grave de la terapia tumoral, suponiendo a veces una amenaza para la vida. Se puede definir como
25 una constelación de anomalías metabólicas que son el resultado de necrosis tumoral o apoptosis fulminante espontáneas o relacionadas con el tratamiento. Las anomalías metabólicas observadas en pacientes de TLS incluyen: hiperkalemia, hiperuricemia e hiperfosfatemia con hipercalcemia secundaria. El TLS también puede conducir a fallo renal agudo (ARF, del inglés "Acute Renal Failure").

30 En la mayoría de los pacientes con carcinoides metastásicos y tumores endocrinos pancreáticos, el tratamiento con medicamentos actuales, tal como octreotide, puede incluir una mejoría rápida de los síntomas clínicos, tales como diarrea, deshidratación, ataques de enrojecimiento, hiperkalemia, ulceración péptica, ataques hipoglucémicos y lesiones cutáneas necróticas (*Kvols et al. 1986, 1987, Ruzsniowski et al.1996, Caplin et al. 1998, Kulke & Mayer 1999, Wymenga et al. 1999*). Sin embargo, la mayoría de los pacientes muestran pérdida de sensibilidad a la inhibición de la secreción hormonal por octreotide y lanreotide en cuestión de semanas a meses. Estas limitaciones
35 de las terapias actuales representan un problema importante.

Los tumores neuroendocrinos, que incluyen tumores endocrinos gastroenteropancreáticos y adenomas pituitarios son enfermedades raras y heterogéneas (Tabla 1). Como consecuencia, su prognosis y la supervivencia a largo
40 plazo no se conocen bien. Independientemente de las perspectivas de supervivencia, las secreciones excesivas de dichos tumores pueden afectar profundamente a la calidad de vida de los individuos afectados, y por lo tanto un tratamiento efectivo de esta función aberrante es requisito para mantener la calidad de vida de los pacientes.

Tabla 1. Incidencia/prevalencia de tumores neuroendocrinos principales (EE.UU. a menos que se indique lo contrario)

Tipo de tumor	Incidencia
Tumores carcinoides	Se diagnostican aproximadamente 5.000 tumores carcinoides al año. Según el "National Cancer Institute" (NCI), aproximadamente el 74% de dichos tumores se originan en el tracto del intestino grueso (GI) y el 25% se producen en el tracto respiratorio.
	Los carcinoides son raros en niños, siendo más comunes en pacientes con edades superiores a los 50 años. Son el doble de comunes en hombres. Los tumores carcinoides del apéndice habitualmente son benignos y a menudo se dan en edades comprendidas entre los 20 y los 40 años.
Insulinomas	La incidencia es de aproximadamente 4 casos por millón y año, y la prevalencia es de aproximadamente 4 por millón de población y año.

Tipo de tumor	Incidencia
Gastrinomas	La incidencia de gastrinomas que se producen esporádicamente o asociados a neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 (MEN-1) es de 0,1-3 por millón. La prevalencia de MEN-1 es de 0,2-2 por 100.000. La MEN-1 se diagnostica en el 30-38% de los pacientes con gastrinomas, mientras que se observa que el 20-61% de los pacientes diagnosticados con MEN-1 presentan gastrinomas asociados a ZES (Síndrome de Zollinger-Ellison).
VIPomas	Prevalencia = 1,12 por millón de población
Glucagonomas	El glucagonoma está clasificado como “enfermedad rara” por la “Office of Rare Diseases” (ORD) del “National Institute of Health” (NIH). Prevalencia = aprox. 1 en 2.720.000 personas de EE.UU.
Prolactinoma	Incidencia: 6-10 por millón y año. Prevalencia: 60-100 por millón
Somatotrofinoma	Prevalencia de acromegalia: 40-60 por millón de personas afectadas en cualquier momento; Incidencia (anual) de Acromegalia: 3 por millón de casos anuales.
Corticotrofinoma	Incidencia: 2-3 por millón y año. Prevalencia: 20-30 por millón
Feocromocitoma	En los países occidentales la prevalencia del feocromocitoma puede estimarse en el rango de 1:6.500 a 1:2.500 con una incidencia anual en los Estados Unidos de 500 a 1.100 casos anuales.
Tirotrofinoma	Muy raro

De forma general, los síntomas de estos tumores varían dependiendo del tipo de tumor, ya que cada uno secreta hormonas diferentes que producen síntomas diferentes (Tabla 2).

Tabla 2. Síntomas o enfermedades producidas por hipersecreción de tumores neuroendocrinos.

Tipo de tumor	Patofisiología y síntomas (producidos por la hipersecreción más que por la masa tumoral)
Tumores carcinoides	Una combinación de síntomas que son resultado de la secreción de hormonas o de sustancias de tipo hormonal (p.ej., serotonina, gastrina, ACTH, histamina) producidas por algunos tumores carcinoides. Dichos síntomas incluyen enrojecimiento, diarrea, dolor abdominal de tipo calambre, hinchamiento de la piel o la cara y el cuello, respiración dificultada, ganancia de peso, aumento del bello corporal y facial, diabetes, dolor de cabeza, edema, lagrimación, debilidad, hipertensión pulmonar, síntomas de fallo cardiaco que incluyen falta de aliento.
Insulinomas	Visión borrosa, diplopía, debilidad, palpitaciones, confusión y comportamiento extraño. Tiende a producirse hipoglucemia 5 horas o así después de una comida y los síntomas asociados pueden verse afectados por la dieta, la ingesta de etanol y el ejercicio.
Gastrinomas	Diarrea, gastritis, úlceras gástricas recurrentes
VIPomas	Diarrea líquida (3-20 litros al día), hipokalemia, hipomagnesemia, hipercalcemia, acidosis, enrojecimiento, vejiga distendida flácida, íleo/subíleo distendido flácido. La diabetes o la intolerancia a la glucosa también son comunes.
Glucagonomas	Sarpullido eritematoso necrótico (a menudo en la cara, las extremidades y áreas intertriginosas), anemia, pérdida de peso, tolerancia a la glucosa afectada, trombosis y diarrea.
Corticotrofinoma	Enfermedad de Cushing como consecuencia de que ACTH induce un exceso de cortisol en circulación
Somatotrofinoma	Acromegalia

Tipo de tumor	Patofisiología y síntomas (producidos por la hipersecreción más que por la masa tumoral)
Prolactinoma	Oligomenorrea/amenorrea, galactorrea, sequedad vaginal, pérdida de libido en mujeres; disfunción sexual (impotencia), galactorrea y ginecomastia en hombres
Feocromocitoma	Un amplio rango de síntomas resultado de acciones metabólicas y hemodinámicas de catecolaminas en circulación. La hipertensión sostenida o paroxismal es el signo clínico más común en más del 90% de los pacientes; con frecuencia decreciente: dolor de cabeza, palpitaciones, palidez, náuseas, enrojecimiento, pérdida de peso, cansancio, ansiedad/pánico, hipotensión ortostática, hiperglucemia
Tirotofinoma	Tirotoxicosis (sobre-actividad de la glándula tiroidea), cuyos síntomas incluyen pérdida de peso a pesar de un aumento del apetito, ritmo cardíaco acelerado, temblores ligeros, nerviosismo e inestabilidad emocional incrementados, intolerancia al calor, y episodio catatónico de excesiva sudoración, ojos hinchados, agrandamiento de la glándula tiroidea; aproximadamente en un tercio de los casos, el tumor también produce un exceso de hormona de crecimiento, dando como resultado una ligera acromegalia

5 Las terapias actuales son altamente individualizadas, ya que los síntomas experimentados por cada paciente a menudo son diferentes y también pueden ir cambiando con el tiempo. Los tres objetivos potenciales del tratamiento de un paciente son (1) eliminar el tumor, (2) frenar o detener el crecimiento del tumor, o (3) aliviar los síntomas provocados por la hipersecreción procedente del tumor – pueden buscarse los tres de forma combinada. A continuación se describen las terapias actuales más comunes.

Tumores carcinoides/síndrome carcinoide

10 A menudo se usa una estrategia doble en el tratamiento del síndrome carcinoide, comenzando con cirugía para eliminar el tumor o para reducir su tamaño, seguida de tratamiento con quimioterapia o interferones. Se puede usar un procedimiento conocido como embolización hepática para controlar el cáncer que se ha extendido desde un tumor carcinoide al hígado; ayuda a reducir los síntomas disminuyendo el aporte sanguíneo al hígado y privando de alimento a las células tumorales.

Insulinomas

15 Los síntomas de los insulinomas a veces pueden tratarse mediante regulación de dieta (p.ej., mediante ingesta frecuente de carbohidratos complejos de liberación lenta; goma guar). Con el insulinoma maligno, se puede producir metástasis a los nodos linfáticos circundantes y al hígado. Si el tumor no puede localizarse antes o durante una cirugía (intra-operativamente), puede ser eliminado a través de pancreatomectomía distal.

Gastrinomas

20 En pacientes con gastrinomas, se usa medicación antisecretora, tal como un inhibidor de bomba de protones, para controlar la hipersecreción de ácido gástrico. Si un paciente no puede tomar esta medicación, se recomienda una gastrectomía total. Se ha demostrado que la cirugía proporciona una tasa de curación a 5 años del 30%, y se recomienda en pacientes sin metástasis al hígado, MEN 1, o condiciones médicas de complicación que puedan limitar la esperanza de vida. (El noventa y cinco por ciento de los pacientes con gastrinomas presentan tumores).
25 Los pacientes con enfermedad metastásica pueden beneficiarse de quimioterapia u octreotida, si la quimioterapia falla.

VIPomas

30 La terapia de primera línea para los VIPomas está dirigida a corregir la profunda hipokalemia, la deshidratación y la acidosis metabólica mediante el recambio de fluidos y electrolitos. Normalmente se administra a los pacientes hasta 5 L de fluido y 350 mEq de potasio al día. El tratamiento óptimo para los VIPomas es la eliminación quirúrgica del tumor principal.

Glucagonomas

35 Se emplea cirugía para aliviar los efectos de los glucagonomas o para reducir el tamaño de los tumores, si bien dos tercios de los pacientes no son curados por la cirugía incluso tras una localización tumoral exitosa y una determinación de la enfermedad metastásica. Actualmente, no existen fármacos activos usados para tratar el glucagonoma.

Prolactinomas

El tratamiento médico habitualmente es con los agonistas de dopamina, bromocriptina o cabergolina. Estos fármacos reducen el tamaño del tumor y devuelven los niveles de prolactina a lo normal en aproximadamente el 80 por ciento de los pacientes. Sin embargo, el uso de dichos agonistas está asociado a efectos secundarios tales como náuseas y mareos. La cirugía es una opción cuando la terapia médica no puede ser tolerada o si falla en la reducción de los niveles de prolactina, en restaurar la reproducción y la función pituitaria normal, y en reducir el tamaño tumoral. Sin embargo, los resultados de la cirugía dependen enormemente del tamaño del tumor y del nivel de prolactina, así como de la habilidad y la experiencia del neurocirujano. Dependiendo del tamaño del tumor y de cuánto se elimine, los estudios muestran que del 20 al 50 por ciento reaparecen, normalmente en los primeros cinco años.

Somatotrofinomas (p.ej., que producen acromegalia)

El tratamiento actual para pacientes con acromegalia incluye cirugía, radiación y terapias médicas. El tratamiento depende del tamaño y de la extensión del tumor y de la necesidad de un rápido cese de la función hormonal que dé como resultado secuelas clínicas serias. Los tratamientos estándar incluyen cirugía (normalmente una estrategia transesfenoidal) con o sin terapia de radiación post-operativa, tratamiento con bromocriptina, tratamiento con octreotida y, más recientemente, tratamiento con pegvisomant. Las terapias descritas anteriormente tienen una tasa de éxito variable.

Corticotrofinomas

Para pacientes con adenomas corticotropos, la microcirugía transesfenoidal es el tratamiento elegido. Sin embargo, las tasas de remisión publicadas en la mayoría de las series son de aproximadamente el 70% al 90%. La terapia con fármacos se considera un adjunto a la microcirugía transesfenoidal en los casos con un tumor residual y en los casos en los que se está esperando a los efectos de la terapia de radiación. Se usan inhibidores de esteroidogénesis, que incluyen mitotano, metirapone, cetoconazol y aminoglutetimide. El cetoconazol es el mejor tolerado de estos agentes, aunque solo en aproximadamente el 70% de los pacientes. Se ha usado terapia de radiación en pacientes considerados malos candidatos a cirugía, y también se ha usado como terapia adjunta en pacientes con tumor activo residual o recurrente.

Feocromocitoma

El procedimiento preferido es la eliminación laparoscópica del tumor. Sin embargo, es necesario mantener al mínimo las complicaciones durante la cirugía mediante un tratamiento médico preoperatorio adecuado para prevenir complicaciones inducidas por catecolamina, graves y potencialmente amenazantes para la vida, durante la cirugía, que incluyen crisis hipertensivas, arritmias cardíacas, edema pulmonar e isquemia cardíaca. Los regímenes tradicionales incluyen bloqueantes de α -adrenoceptor, bloqueantes combinados de α/β -adrenoceptor, bloqueantes del canal de calcio, todos los cuales pueden presentar efectos no deseados tanto antes como después de la cirugía.

Tirotrofinomas

La cirugía transesfenoidal es el tratamiento elegido para pacientes con adenomas tirotróficos. Se puede emplear terapia de radiación adyuvante cuando se sabe que la cirugía no va a ser curativa incluso si el paciente todavía está eutiroides debido a que la recaída es inevitable, y el efecto completo de la terapia de radiación requiere meses o años. Puede requerirse terapia médica para pacientes que todavía presentan síntomas hipertiroides a pesar de la cirugía y la radiación externa.

Además de representar afecciones humanas raras, pero amenazantes para la vida, los tumores neuroendocrinos siguen suponiendo un problema para el cuidado animal a escala global. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de agentes terapéuticos y terapias alternativas y/o mejoradas que aborden uno o más de los problemas anteriores.

En todos los casos, la cirugía puede tener un éxito limitado, además de comportar riesgos inherentes para el paciente. Adicionalmente, los tratamientos con fármacos actuales tampoco son una garantía de éxito para aliviar los síntomas en todos los pacientes.

El documento WO2006/025976 describe métodos para tratar diversos cánceres mediante administración local de una neurotoxina de botulinum o en las proximidades del cáncer.

La presente invención resuelve uno o más de los anteriores problemas o riesgos asociados a la cirugía o a las terapias médicas existentes, proporcionando una nueva categoría de agente no citotóxico diseñado para suprimir secreciones tumorales pituitarias no deseadas (p.ej. anormalmente elevadas) y de esta manera minimizar o revertir la enfermedad resultante, que es la acromegalia.

En más detalle, un primer aspecto de la presente invención proporciona un polipéptido para uso en la supresión de la secreción de una célula tumoral neuroendocrina para el tratamiento de la acromegalia, tal como se define en las reivindicaciones.

5 Al ser usado, un polipéptido como el descrito en la presente memoria, se une a una célula tumoral neuroendocrina. Después de eso, el componente de traslocalización efectúa el transporte del componente de proteasa al citosol de la célula tumoral. Finalmente, una vez dentro, la proteasa inhibe el proceso de fusión exocítica de la célula tumoral neuroendocrina. Por tanto, desactivando el aparato de fusión exocítica de la célula tumoral neuroendocrina, el polipéptido de la invención inhibe la secreción desde la misma. Consecuentemente, el polipéptido descrito en la presente memoria suprime/ trata uno o más de las diversas afecciones o síntomas patofisiológicos enumerados
10 anteriormente en la Tabla 2.

Las células diana principales descritas en la presente memoria son células tumorales de origen neuroendocrino que secretan una o más hormonas (u otras moléculas bioactivas) que conducen al desarrollo de una afección patofisiológica.

15 Los polipéptidos descritos en la presente memoria son capaces (y se usan para ello) de suprimir la secreción de hormonas y/u otras moléculas bioactivas desde los tumores neuroendocrinos.

Sin pretender establecer teoría alguna, los inventores de la presente creen que la secreción no deseada (p.ej., de niveles elevados) de moléculas fisiológicamente activas desde tumores neuroendocrinos produce y mantiene afecciones patológicas en un paciente. Por lo tanto, inhibiendo dichas secreciones, se puede detener la progresión del estado de enfermedad y se pueden revertir los síntomas.

20 Los polipéptidos descritos en la presente memoria son particularmente adecuados para el tratamiento de una serie de tumores neuroendocrinos, incluyendo sus metástasis de secreción hormonal, afecciones precancerosas y los síntomas de los mismos. En este respecto, "tratamiento" incluye reducir o eliminar las secreciones excesivas desde dichas células. A modo de ejemplo, las células tumorales neuroendocrinas diana importantes descritas en la presente memoria incluyen: adenomas pituitarios y/ o tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos (GEP-
25 NETs). Los GEP-NETs se localizan principalmente en el estómago, el intestino o el páncreas y secretan cantidades excesivas de hormonas y otras moléculas bioactivas que normalmente son secretadas en niveles inferiores bajo una regulación fisiológica. Estas secreciones contribuyen a los síntomas experimentados por los pacientes. Los GEP-NETs pueden dividirse en los subtipos carcinoide y no carcinoide.

30 Los GEP-NETs carcinoideos (55% del total de GEP-NETs) tienden a clasificarse según su localización tisular e incluyen, en orden de prevalencia, los que surgen en células del apéndice (39%), el íleo (23%), el recto (13%) y los bronquios (11,5%). Los GEP-NETs no carcinoideos incluyen insulinomas de las isletas pancreáticas que secretan un exceso de insulina (17%), tumores de tipo desconocido (15%), gastrinomas del páncreas o del duodeno que secretan un exceso de gastrina (9%), VIPomas del páncreas, del pulmón o ganglioneuromas, que secretan un exceso de polipéptido intestinal vasoactivo, y glucagonomas, tumores de las isletas pancreáticas que secretan un
35 exceso de glucagón.

Los tumores pituitarios, que tienden a clasificarse según su tipo de secreción o su identidad celular, incluyen prolactinomas que secretan prolactina (el más común), somatotrofinomas (hormona del crecimiento, corticotrofinomas (hormona adrenocorticotrófica), tirotrofinomas (hormona estimulante de tiroides), gonadotrofinomas (FSH, LH), y adenomas pituitarios no funcionales.

40 Otros tumores secretores incluyen tumores medulares tiroideos, tumores pulmonares de célula pequeña y no pequeña, tumores de célula de Merkel, y feocromocitomas. Este último puede ser mortal si el exceso de adrenalina secretada conduce a una hipertensión grave. Dicha hipertensión puede hacer que el individuo no sea adecuado para cirugía de eliminación de la masa tumoral y por tanto puede surgir un ciclo pernicioso de refuerzo y es deseable el tratamiento del tumor para minimizar la secreción.

45 Un subconjunto particular de células tumorales neuroendocrinas es: insulinomas, gastrinomas, VIPomas, glucagonomas, prolactinomas, somatotrofinomas, corticotrofinomas, tirotrofinomas y feocromocitomas.

Suprimiendo las funciones secretoras de las células tumorales neuroendocrinas (tales como el anterior subconjunto de células tumorales), la presente solicitud describe una terapia para el tratamiento de, entre otras, afecciones tales como la enfermedad de Cushing, acromegalia, síndrome carcinoide, síndrome hipoglucémico, eritema migratorio necrolítico, síndrome de Zollinger-Ellison y síndrome de Verner-Morrison. También se proporcionan terapias para el
50 tratamiento de los síntomas que suceden a secreciones tumorales neuroendocrinas no deseadas (ver la Tabla 2).

El componente "bioactivo" de los polipéptidos de la presente invención es proporcionado por una proteasa no citotóxica como se define en las reivindicaciones. Dicho grupo distintivo de proteasas actúa rompiendo proteolíticamente las proteínas de transporte intracelular conocidas como proteínas SNARE (p.ej., SNAP-25, VAMP o Sintaxina) – ver Gerald K (2002) "Cell and Molecular Biology" (4ª edición) John Wiley & Sons, Inc. El acrónimo SNARE deriva del término en inglés "**S**oluble **N**SF **A**ttachment **R**eceptor" (Receptor de unión de NSF soluble), en donde NSF significa "**N**-ethylmaleimide-**S**ensitive **F**actor" (factor sensible a N-etilmaleimida). Las proteínas SNARE

son integrales a la formación de vesícula intracelular, y por tanto a la secreción de moléculas a través del transporte vesicular desde una célula. Por consiguiente, una vez administradas a una célula diana deseada, la proteasa no citotóxica es capaz de inhibir la secreción celular desde la célula diana.

5 Las proteasas no citotóxicas son una clase discreta de moléculas que no matan células; en su lugar, actúan inhibiendo procesos celulares diferentes a la síntesis de proteínas. Las proteasas no citotóxicas son producidas como parte de una molécula toxina más grande por una variedad de plantas, y por una variedad de microorganismos tales como *Clostridium* sp. y *Neisseria* sp.

10 Las neurotoxinas clostridiales representan un grupo principal de moléculas toxina no citotóxicas, y comprenden dos cadenas de polipéptido unidas por un enlace disulfuro. Las dos cadenas se denominan cadena pesada (cadena-H), que tiene una masa molecular de aproximadamente 100 kDa, y la cadena ligera (cadena-L), que tiene una masa molecular de aproximadamente 50 kDa. Es la cadena-L la que posee una función de proteasa y exhibe una elevada especificidad de sustrato para proteínas de vesícula y/o asociadas a membrana plasmática (SNARE) implicadas en el proceso exocítico (p.ej., sinaptobrevina, sintaxina o SNAP-25). Estos sustratos son componentes importantes de la maquinaria neurosecretora.

15 *Neisseria* sp., de forma más destacada de la especie *N. gonorrhoeae*, y *Streptococcus* sp., de forma más destacada de la especie *S. pneumoniae*, producen moléculas toxina no citotóxicas funcionalmente similares. Un ejemplo de dichas proteasas no citotóxicas es la IgA proteasa (ver WO99/58571). Por tanto, la proteasa no citotóxica de la presente invención es una proteasa neurotoxina clostridial o una IgA proteasa.

20 Pasando ahora al componente de resto dirigido a diana (TM, del inglés "Targeting Moiety") de la presente invención, es el componente que une los polipéptidos descritos en la presente memoria a una célula tumoral neuroendocrina.

De esta manera, un TM descrito en la presente memoria se une a un receptor en una célula tumoral neuroendocrina. A modo de ejemplo, un TM descrito en la presente memoria puede unirse a un receptor seleccionado del grupo que comprende: un receptor de somatostatina (sst), que incluye variantes de división del mismo (p.ej., sst₁, sst₂, sst₃, sst₄ y sst₅); un receptor de hormona de liberación de hormona del crecimiento (GHRH) – también conocido como receptor de GRF; un receptor de grelina, un receptor de bombesina (p.ej., BRS-1, BRS-2, o BRS-3); un receptor de urotensina (p.ej., un receptor de urotensina II); un receptor de hormona de concentración de melanina 1; un receptor de hormona de liberación de prolactina; un receptor de hormona de liberación de gonadotropina (GnRHR) tal como un GnRHR de Tipo 1 y/o un receptor de GnRHR de Tipo 2; y/o un receptor de KiSS-1.

30 En la presente memoria se describen TMs que se unen a un receptor de somatostatina (SST). Los ejemplos de TMs de péptido de SST adecuados incluyen SST de longitud completa y cortistaina (CST), así como truncamientos y análogos de péptido de los mismos, tales como: SANSNPAMAPRERKAGCKNFFWKTFTSC (SST-28); AGCKNFFWKTFTSC (SST-14); QEGAPPQQSARRDRMPCRNFFWKTFFSCK (CST-29); QERPPLQQPPHRDKKPKCNFFWKTFFSCK (CST-29); QERPPPQQPPHLDKKPKCNFFWKTFFSCK (CST-29); DRMPCRNFFWKTFFSCK (CST-17); PCRNFFWKTFFSCK (CST-14); y PCKNFFWKTFFSCK (CST-14); D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂ (BIM 23052), D-Phe-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-D-Nal-NH₂ (BIM 23056) o c[Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂ (BIM23268); péptidos de octreotide, péptidos de lanreotide, BIM23027, CYN154806, BIM23027, péptidos de vapreotide, péptidos de seglitide y SOM230. Estos TMs se unen a receptores sst, tales como los receptores sst₁, sst₂, sst₃, sst₄ y sst₅, que están presentes en células tumorales neuroendocrinas relevantes para la presente invención – ver la Tabla 3. SST y CST presentan homología estructural, y se unen a todos los receptores sst conocidos.

Tabla 3

Expresión de subtipos de receptor de somatostatina en tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos (%)					
	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5
Todos los tumores	68	86	46	93	57
Insulinoma	33	100	33	100	67
Gastrinoma	33	50	17	83	50
Glucagonoma	67	100	67	67	67
VIPoma	100	100	100	100	100

Expresión de subtipos de receptor de somatostatina en tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos (%)					
	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5
No funcional	80	100	40	100	60
NETs de vientre medio	80	95	65	35	75

- Un TM de la presente invención se une a un receptor de hormona de liberación de hormona de crecimiento (GHRH). La GHRH también es conocida como factor de liberación de hormona de crecimiento (GRF o GHRF) o somatocrina. Los péptidos de GHRH adecuados incluyen el péptido GHRH completo (1-44), y truncamientos del mismo tales como GHRH(1-27, 1-28, 1-29), GHRH(1-37), y GHRH(1-40, 1-43)-OH, así como péptidos análogos tales como BIM 28011 o NC-9-96; [MeTyr1,Ala15,22,Nle27]-hGHRH(1-29)-NH₂; MeTyr1,Ala8,9,15,22,28,Nle27]-hGHRH(1-29)-NH₂; ciclo(25-29)[MeTyr1,Ala15,DAsp25,Nle27,Orn29+ ++]-hGHRH(1-29)-NH₂; (D-Tyr1)-GHRH (1-29)-NH₂; (D-Ala2)-GHRH (1-29)-NH₂; (D-Asp3)-GHRH (1-29)-NH₂; (D-Ala4)-GHRH (1-29)-NH₂; (D-Thr7)-GHRH (1-29)-NH₂; (D-Asn8)-GHRH (1-29)-NH₂; (D-Ser9)-GHRH (1-29)-NH₂; (D-Tyr10)-GHRH (1-29)-NH₂; (Phe4)-GHRH (1-29)-NH₂; (pCl-Phe6)-GHRH (1-29)-NH₂; (N-Ac-Tyr1)-GHRH (1-29)-NH₂; (N-Ac-Tyr1, D-Ala2)-GHRH (1-29)-NH₂; (N-Ac-D-Tyr1, D-Ala2)-GHRH (1-29)-NH₂; (N-Ac-D-Tyr1, D-Ala 2, D-Asp3)-GHRH (1-29)-NH₂; (D-Ala2, NLeu27)-GHRH (1-29)-NH₂; (His1, D-Ala2, NLeu27)-GHRH (1-29)-NH₂; (N-Ac-His1, D-Ala2, N-Leu27)-GHRH (1-29)-NH₂; (His1, D-Ala 2, D-Ala 4, Nleu27)-GHRH (1-29)-NH₂; (D-Ala2, D-Asp3, D-Asn8, NLeu27)-GHRH (1-29)-NH₂; (D-Asp3, D-Asn8, NLeu27)-GHRH (1-29)-NH₂; [His1, NLeu27]-hGHRH(1-29)-NH₂; [NLeu27]-hGHRH(1-29)-NH₂; H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH₂; H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH₂; H-Tyr-D-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-NH₂; H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Ile-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Gln-Gly-Ala-Lys-Val-Arg-Leu-NH₂; H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Ala-Lys-Val-Arg-Leu-NH₂; His-Val-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Gln-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg; His-Val-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Gln-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Leu-Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala.
- En la presente memoria se describen TMs que se unen a un receptor de grelina. Los ejemplos de TMs adecuados en este aspecto incluyen: péptidos de grelina tales como grelina de longitud completa (p.ej., grelina₁₇) y truncamientos y péptidos análogos de la misma, tales como grelina₂₄₋₁₁₇, grelina₅₂₋₁₁₇, [Trp3, Arg5]-grelina (1-5), des-Gln-Grelina, cortistatina-8, His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂, péptido de liberación de hormona del crecimiento (p.ej., GHRP-6) o hexarelina.
- En la presente memoria se describen TMs que se unen a un receptor de bombesina (p.ej., BRS-1, BRS-2 o BRS-3). Los ejemplos de péptidos de bombesina incluyen bombesina de longitud completa – un péptido de 14 aminoácidos aislado originalmente de la piel de una rana (pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂); y los dos homólogos conocidos en mamíferos, a saber, neuromedina B, y péptido de liberación de gastrina (GRP) tal como: GRP porcino - Ala-Pro-Val-Ser-Val-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂, y GRP humano - Val-Pro-Leu-Pro-Ala-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Thr-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂. La referencia a péptidos de bombesina abarca sus homólogos tales como neuromedina B y GRP, e incluye truncamientos y péptidos análogos de los mismos.
- En la presente memoria se describen TMs que se unen a receptor de urotensina. Los TMs adecuados en este aspecto incluyen péptidos de urotensina tales como Urotensina-II (U-II), que es un neuropéptido cíclico. La región cíclica C-terminal de U-II está fuertemente conservada a lo largo de diferentes especies, e incluye los seis residuos de aminoácido (-Cys Ple-Trp-Lys-Tyr-Cys-), que es estructuralmente similar a la región central de la somatostatina-14 (-Phe-Trp-Lys-Thr-). Los péptidos de urotensina de la presente invención incluyen los péptidos precursores de U-II, tales como prepro-urotensina-II (que incluye las dos isoformas humanas de la misma, 134 y 139) así como otros truncamientos tales como la forma de péptido maduro de once residuos y péptidos análogos del mismo.
- En la presente memoria se describen TMs que se unen a receptor de hormona de concentración de melanina 1. Los ejemplos de TMs en este aspecto incluyen: péptidos de hormona de concentración de melanina (MCH) tales como MCH de longitud completa, truncamientos y análogos de la misma.
- En la presente memoria se describen TMs que se unen a un receptor de hormona de liberación de prolactina. Un ejemplo de un TM adecuado en este aspecto incluye el péptido de liberación de prolactina, truncamientos y análogos del mismo.

En la presente memoria se describen TMs que se unen a receptor de hormona de liberación de gonadotropina (GnRH). El GnRH también es conocido como hormona de liberación de hormona luteinizante (LHRH). Los ejemplos de TMs de receptor de GnRH incluyen: péptidos de GnRHI, péptidos de GnRHII y péptidos de GnRHIII, por ejemplo el polipéptido precursor de GnRH de longitud completa, 92 aminoácidos, y truncamientos del mismo tales como el decapeptido piroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly CONH₂.

En la presente memoria se describen TMs que se unen a un receptor KiSS-1. Los ejemplos de TMs adecuados en este aspecto incluyen los péptidos Kisspeptina-10, Kisspeptina-54, truncamientos y análogos de los mismos.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de materia, esto es, un polipéptido tal como se define en las reivindicaciones.

10 Todas las características del primer aspecto de la presente invención se aplican igualmente al mencionado segundo aspecto.

En una realización preferida del primer y/ o del segundo aspectos de la presente invención, el TM presenta una secuencia de aminoácidos de péptido humano. Por tanto, un TM altamente preferido es un péptido de GHRH humano.

15 **Preparación del polipéptido**

Los polipéptidos de la presente invención comprenden 3 componentes principales: un compuesto "bioactivo" (es decir, una proteasa no citotóxica); un TM; y un dominio de traslocalización. La tecnología general asociada a la preparación de dichas proteínas de fusión a menudo se denomina tecnología de toxina re-atacada. A modo de ejemplo, nos referimos a: WO94/21300; WO96/33273; WO98/07864; WO00/10598; WO01/21213; WO06/059093; WO00/62814; WO00/04926; WO93/15766; WO00/61192 y WO99/58571.

Más detalladamente, el componente TM de la presente invención puede fusionarse tanto al componente de proteasa como al componente de traslocalización de la presente invención. Dicha fusión preferiblemente es a través de un enlace covalente, por ejemplo, tanto un enlace covalente directo como a través de una molécula espaciadora/ligando. El componente de proteasa y el componente de traslocalización están unidos preferiblemente mediante un enlace covalente, por ejemplo un enlace covalente directo o una molécula espaciadora/ligando. Las moléculas espaciadoras/ligando adecuadas son bien conocidas en la técnica, y típicamente comprenden una secuencia basada en aminoácidos de entre 5 y 40, preferiblemente entre 10 y 30 residuos de aminoácido de longitud.

En el uso, los polipéptidos presentan una conformación di-cadena, en donde el componente de proteasa y el componente de traslocalización están unidos, preferiblemente a través de un enlace disulfuro.

30 Los polipéptidos de la presente invención pueden prepararse mediante técnicas de conjugación química convencionales, que son bien conocidas por los especialistas en la técnica. A modo de ejemplo, se hace referencia a Hermanson, G.T. (1996), Bioconjugate techniques, Academic Press, y a Wong, S.S. (1991), Chemistry of protein conjugation and cross-linking, CRC Press, Nagy et al., PNAS 95 p1794-99 (1998). Otras metodologías detalladas para la unión de TMs sintéticos a un polipéptido de la presente invención se proporcionan, por ejemplo, en EP0257742.

De forma alternativa, los polipéptidos pueden prepararse mediante preparación recombinante de una proteína de fusión de polipéptido individual (véase, por ejemplo, WO98/07864). Esta técnica se basa en el mecanismo bacteriano in vivo mediante el cual se prepara la neurotoxina clostridial nativa (es decir, holotoxina), y da como resultado una proteína de fusión que presenta la siguiente disposición estructural "simplificada":

40 NH₂ - [componente proteasa] - [componente traslocalización] - [TM] - COOH

Según el documento WO98/07864, el TM se coloca hacia el extremo C-terminal de la proteína de fusión. La proteína de fusión es activada a continuación mediante tratamiento con una proteasa, que ejerce la ruptura en un sitio entre el componente de proteasa y el componente de traslocalización. De este modo se produce una proteína di-cadena, que comprende el componente de proteasa como cadena de polipéptido individual unida covalentemente (a través de un puente disulfuro) a otra cadena de polipéptido individual que contiene el componente de traslocalización más TM.

Alternativamente, según el documento WO06/059093, el componente TM de la proteína de fusión está localizado hacia la mitad de la secuencia de la proteína de fusión lineal, entre el sitio de ruptura de proteasa y el componente de traslocalización. Esto asegura que el TM se una al dominio de traslocalización (es decir, como ocurre con la holotoxina clostridial nativa), aunque en este caso los dos componentes están en orden inverso con respecto a la holotoxina nativa. La posterior ruptura en el sitio de ruptura de proteasa expone la porción N-terminal del TM, y proporciona la proteína de fusión de polipéptido di-cadena.

La(s) secuencia(s) de ruptura de proteasa mencionadas anteriormente pueden introducirse (y/ o eliminar cualquier secuencia de ruptura inherente) a nivel de ADN empleando medios convencionales, tales como mutagénesis sito-

dirigida. Se puede llevar a cabo un escrutinio para confirmar la presencia de secuencias de ruptura manualmente o con la ayuda de un software de ordenador (p.ej., el programa MapDraw de DNASTAR, Inc.). Aunque se puede emplear cualquier sitio de ruptura de proteasa (esto es, clostridial o no clostridial), los preferidos son los siguientes:

Enteroquinasa	(DDDDK↓)
Factor Xa	(IEGR↓ / IDGR↓)
TEV (Virus del grabado del tabaco)	(ENLYFQ↓G)
Trombina	(LVPR↓GS)
PreScission	(LEVLFQ↓GP).

5 Otros sitios de ruptura de proteasa adicionales incluyen secuencias de reconocimiento que son divididas por una proteasa no citotóxica, por ejemplo, por una neurotoxina clostridial. Éstas incluyen las secuencias de reconocimiento de proteína SNARE (p.ej., SNAP-25, sintaxina, VAMP) que son divididas por proteasas no citotóxicas tales como las neurotoxinas clostridiales. En el documento US2007/0166332 se proporcionan ejemplos concretos.

10 El término sitio de ruptura de proteasa también abarca una inteína, que es una secuencia auto-divisora. La reacción de auto-división es controlable, por ejemplo variando la concentración de agente reductor presente. También se puede emplear la “activación” de sitios de ruptura mencionada anteriormente como un sitio de ruptura “destrutivo” (discutido más adelante), en caso de que se incorpore uno a un polipéptido de la presente invención.

15 En una realización preferida, la proteína de fusión de la presente invención puede comprender una o más etiquetas de purificación localizadas N-terminal y/ o C-terminal. Aunque se puede emplear cualquier etiqueta de purificación, se prefieren las siguientes:

etiqueta-His (p.ej., 6 × histidina), preferiblemente como una etiqueta C-terminal y/ o N-terminal

etiqueta-MBP (proteína de unión a maltosa), preferiblemente como una etiqueta N-terminal

etiqueta-GST (glutathiona-S-transferasa), preferiblemente como una etiqueta N-terminal

etiqueta-His-MBP, preferiblemente como una etiqueta N-terminal

20 etiqueta-GST-MBP, preferiblemente como una etiqueta N-terminal

etiqueta-Tiorredoxina, preferiblemente como una etiqueta N-terminal

etiqueta-CBD (Dominio de Unión a Quitina), preferiblemente como una etiqueta N-terminal.

25 Se pueden incluir uno o más péptidos espaciadores/ moléculas ligando en la proteína de fusión. Por ejemplo, se puede emplear un péptido espaciador entre una etiqueta de purificación y el resto de la molécula de proteína de fusión.

Por tanto, un tercer aspecto de la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico (p.ej., ADN) que codifica un polipéptido como se ha descrito anteriormente (es decir, el segundo aspecto de la presente invención).

30 Dicho ácido nucleico puede incluirse en la forma de un vector, tal como un plásmido, que opcionalmente puede incluir uno o más de un origen de replicación, un sitio de integración de ácido nucleico, un promotor, un terminador y un sitio de unión a ribosoma.

La presente invención también incluye un método para expresar la secuencia de ácido nucleico descrita anteriormente (es decir, el tercer aspecto de la presente invención) en una célula hospedante, en particular *E. coli* o a través de un sistema de expresión de baculovirus.

35 La presente invención también incluye un método para activar un polipéptido de la presente invención, comprendiendo dicho método la puesta en contacto del polipéptido con una proteasa que divide el polipéptido en un sitio de reconocimiento (sitio de ruptura) localizado entre el componente de proteasa no citotóxica y el componente de traslocalización, convirtiendo de este modo el polipéptido en un polipéptido di-cadena en donde los componentes de proteasa no citotóxica y de traslocalización están unidos a través de un enlace disulfuro. En una realización preferida, el sitio de reconocimiento no es nativo para una neurotoxina clostridial natural y/ o para una IgA proteasa natural.

40

- Los polipéptidos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para reducir o para prevenir efectos secundarios no deseados asociados a la dispersión a áreas que no son un objetivo. Según esta realización, el polipéptido comprende un sitio de ruptura destructiva. El sitio de ruptura destructiva es diferente del sitio de "activación" (es decir, formación de di-cadenas), y puede ser dividido por una segunda proteasa y no por la proteasa no citotóxica. Además, cuando es dividido de este modo en el sitio de ruptura destructiva por la segunda proteasa, el polipéptido presenta una potencia reducida (p.ej., una capacidad de unión reducida a la célula diana objetivo, una actividad de traslocalización reducida y/ o una actividad de proteasa no citotóxica reducida). Por completar, cualesquier sitios de ruptura "destructivos" de la presente invención pueden emplearse por separado como un sitio de "activación" en un polipéptido de la presente invención.
- 5
- 10 Por tanto, según esta realización, la presente invención proporciona un polipéptido que puede desactivarse y/ o destruirse de forma controlable en una localización apartada.
- En una realización preferida, el sitio de ruptura destructiva es reconocido y atacado por una segunda proteasa (es decir, una proteasa destructiva) seleccionada entre una proteasa en circulación (p.ej., una proteasa extracelular, tal como una proteasa en suero o una proteasa de la cascada de coagulación sanguínea), una proteasa asociada a tejido (p.ej., una metaloproteasa de matriz (MMP), tal como una MMP de músculo), y una proteasa intracelular (preferiblemente una proteasa que esté ausente de la célula diana).
- 15
- Por tanto, durante el uso, en caso de que un polipéptido de la presente invención sea dispersado lejos de su célula diana objetivo y/ o sea procesado por una célula no diana, el polipéptido se desactivará por ruptura del sitio de ruptura destructiva (por la segunda proteasa).
- 20
- En una realización, el sitio de ruptura destructiva es reconocido y atacado por una segunda proteasa que está presente dentro de un tipo celular apartado del sitio. En esta realización, la célula apartada y la célula diana son preferiblemente de tipos celulares diferentes. Alternativamente (o adicionalmente), el sitio de ruptura destructiva es reconocido y atacado por una segunda proteasa que está presente en una localización apartada (p.ej., distal con respecto a la célula diana). Por consiguiente, cuando se produce la ruptura destructiva extracelularmente, la célula diana y la célula apartada pueden ser del mismo tipo celular o de diferente tipo celular. En este aspecto, la célula diana y la célula apartada pueden poseer cada una un receptor al cual se une el mismo polipéptido de la invención.
- 25
- El sitio de ruptura destructiva de la presente invención proporciona la desactivación/ destrucción del polipéptido cuando el polipéptido está en una localización apartada. En este aspecto, la ruptura del sitio de ruptura destructiva minimiza la potencia del polipéptido (en comparación con un polipéptido idéntico que carece del mismo sitio de ruptura destructiva, o que posee el mismo sitio de ruptura destructiva pero en forma no dividida). A modo de ejemplo, una potencia reducida incluye: una unión reducida (a un receptor de célula de mamífero) y/ o una traslocalización reducida (a lo largo de la membrana endosomal de una célula de mamífero en la dirección del citosol), y/ o una ruptura de proteína SNARE reducida.
- 30
- Cuando se selecciona(n) sitio(s) de ruptura destructiva en el contexto de la presente invención, es preferible que el sitio(s) de ruptura destructiva no sea(n) sustrato(s) para ninguna proteasa que pueda usarse separadamente para una modificación post-traducciona del polipéptido de la presente invención como parte de su proceso de fabricación. A este respecto, las proteasas no citotóxicas de la presente invención emplean típicamente un evento de activación de proteasa (a través de un sitio de ruptura de proteasa de "activación" separado, que es estructuralmente distinto del sitio de ruptura destructiva de la presente invención). El propósito del sitio de ruptura de activación es romper un enlace peptídico entre la proteasa no citotóxica y los componentes de traslocalización o de unión del polipéptido de la presente invención, proporcionando de este modo un polipéptido di-cadena "activado" en donde los dos componentes están unidos a través de un enlace disulfuro.
- 35
- 40
- Por tanto, para ayudar a asegurar que el(los) sitio(s) de ruptura destructiva de los polipéptidos de la presente invención no afectan negativamente al sitio de ruptura de "activación" y a la posterior formación de enlace disulfuro, los primeros son introducidos preferiblemente al polipéptido de la presente invención en una posición alejada en al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, y más preferiblemente al menos 60, al menos 70, al menos 80 residuos de aminoácido (contiguos) del sitio de ruptura de "activación".
- 45
- El(los) sitio(s) de ruptura destructiva y el sitio de ruptura de activación son preferiblemente exógenos (es decir, modificados/ artificiales) con respecto a los componentes nativos del polipéptido. En otras palabras, dichos sitios de ruptura preferiblemente no son inherentes a los correspondientes componentes nativos del polipéptido. A modo de ejemplo, se puede diseñar una proteasa o componente de traslocalización basado en cadena-L o cadena-H de BoNT/A (respectivamente) según la presente invención para incluir un sitio de ruptura. Dicho sitio de ruptura, sin embargo, no estaría presente en la correspondiente cadena-H o cadena-H de BoNT nativa. De forma similar, cuando el componente de Resto dirigido a diana (TM) del polipéptido se modifica para incluir un sitio de ruptura de proteasa, dicho sitio de ruptura no estaría presente en la correspondiente secuencia nativa del correspondiente Resto dirigido a diana.
- 50
- 55
- En una realización preferida de la presente invención, el(los) sitio(s) de ruptura destructiva y el sitio de ruptura de "activación" no son atacados por la misma proteasa. En una realización, los dos sitios de ruptura difieren uno del otro

en que al menos uno, más preferiblemente al menos dos, de forma particularmente preferible al menos tres, y lo más preferiblemente al menos cuatro de los aminoácidos tolerados dentro de las respectivas secuencias de reconocimiento sea(n) diferente(s).

5 A modo de ejemplo, en el caso de una polipéptido quimérico que contiene un sitio de “activación” de Factor Xa entre los componentes de cadena-L y H_N, es preferible emplear un sitio de ruptura destructiva que sea un sitio diferente a un sitio de Factor Xa, que puede insertarse en otro sitio de el(los) componente(s) de cadena-L y/ o H_N y/ o TM. En este escenario, el polipéptido puede ser modificado para acomodar un sitio de “activación” alternativo entre los componentes de cadena-L y H_N (por ejemplo, un sitio de ruptura de enteroquinasa), en cuyo caso se puede incorporar un sitio de ruptura de Factor Xa separado en otro sitio del polipéptido como sitio de ruptura destructiva.
10 Alternativamente, el sitio de “activación” de Factor Xa existente entre los componentes de cadena-L y HN puede ser retenido, y se puede incorporar un sitio de ruptura alternativo como sitio de ruptura destructiva, tal como un sitio de ruptura de trombina.

15 Cuando se identifican sitios adecuados dentro de la secuencia primaria de cualquiera de los componentes de la presente invención para la inclusión de sitio(s) de ruptura, es preferible seleccionar una secuencia primaria que coincida estrechamente con el sitio de ruptura propuesto que va a ser insertado. De este modo, se introducen cambios estructurales mínimos en el polipéptido. A modo de ejemplo, los sitios de ruptura típicamente comprenden al menos 3 residuos de aminoácido contiguos. Por tanto, en una realización preferida, se selecciona un sitio de ruptura que ya posee (en la(s) posición(es) correcta(s) al menos uno, preferiblemente al menos dos de los residuos de aminoácido requeridos para introducir el nuevo sitio de ruptura. A modo de ejemplo, en una realización, se puede introducir el sitio de ruptura de Caspasa 3 (DMQD). A este respecto, se identifica una posición de inserción preferida que ya incluye una secuencia primaria seleccionada, por ejemplo, entre Dxxx, xMxx, xxQx, xxxD, DMxx, DxQx, DxxD, xMQx, xMxD, xxQD, DMQx, xMQD, DxQD y DMxD.

20

De forma similar, es preferible introducir los sitios de ruptura en regiones expuestas superficialmente. Dentro de las regiones expuestas superficialmente, se prefieren las regiones de lazo existentes.

25 En una realización preferida de la presente invención, el(los) sitio(s) de ruptura destructiva se introduce(n) en una o más de las siguientes posiciones, que están basadas en la secuencia de aminoácidos primaria de BoNT/A. Aunque las posiciones de inserción se identifican (por conveniencia) en referencia a BoNT/A, las secuencias de aminoácido primarias de dominios de proteasa alternativos y/ o de dominios de traslocalización pueden ser alineadas fácilmente con dichas posiciones BoNT/A.

30 Para el componente de proteasa, se prefieren una o más de las siguientes posiciones: 27-31, 56-63, 73-75, 78-81, 99-105, 120-124, 137-144, 161-165, 169-173, 187-194, 202-214, 237-241, 243-250, 300-304, 323-335, 375-382, 391-400 y 413-423. La numeración anterior comienza preferiblemente desde el extremo N del componente de proteasa de la presente invención.

35 En una realización preferida, el(los) sitio(s) de ruptura destructiva se localiza(n) en una posición situada a más de 8 residuos de aminoácido, preferiblemente a más de 10 residuos de aminoácido, más preferiblemente a más de 25 residuos de aminoácido, de forma particular preferiblemente a más de 50 residuos de aminoácido, del extremo N del componente de proteasa. De forma similar, en una realización preferida, el(los) sitio(s) de ruptura destructiva se localiza(n) en una posición situada a más de 20 residuos de aminoácido, preferiblemente a más de 30 residuos de aminoácido, más preferiblemente a más de 40 residuos de aminoácido, de forma particular preferiblemente a más de 50 residuos de aminoácido, del extremo C del componente de proteasa.
40

45 Para el componente de traslocalización, se prefiere una o más de las siguientes posiciones: 474-479, 483-495, 507-543, 557-567, 576-580, 618-631, 643-650, 669-677, 751-767, 823-834, 845-859. La numeración anterior preferiblemente reconoce una posición de inicio de 449 para el extremo N del componente de dominio de traslocalización de la presente invención, y una posición de finalización de 871 para el extremo C del componente de dominio de traslocalización.

50 En una realización preferida, el(los) sitio(s) de ruptura destructiva se localiza(n) en una posición situada a más de 10 residuos de aminoácido, preferiblemente a más de 25 residuos de aminoácido, más preferiblemente a más de 40 residuos de aminoácido, de forma particular preferiblemente a más de 50 residuos de aminoácido, del extremo N del componente de traslocalización. De forma similar, en una realización preferida, el(los) sitio(s) de ruptura destructiva se localiza(n) en una posición situada a más de 10 residuos de aminoácido, preferiblemente a más de 25 residuos de aminoácido, más preferiblemente a más de 40 residuos de aminoácido, de forma particular preferiblemente a más de 50 residuos de aminoácido, del extremo C del componente de traslocalización.

55 En una realización preferida, el(los) sitio(s) de ruptura destructiva se localiza(n) en una posición situada a más de 10 residuos de aminoácido, preferiblemente a más de 25 residuos de aminoácido, más preferiblemente a más de 40 residuos de aminoácido, de forma particular preferiblemente a más de 50 residuos de aminoácido, del extremo N del componente TM. De forma similar, en una realización preferida, el(los) sitio(s) de ruptura destructiva se localiza(n) en una posición situada a más de 10 residuos de aminoácido, preferiblemente a más de 25 residuos de aminoácido,

más preferiblemente a más de 40 residuos de aminoácido, de forma particular preferiblemente a más de 50 residuos de aminoácido, del extremo C del componente TM.

5 El polipéptido de la presente invención puede incluir uno o más sitios (p.ej., dos, tres, cuatro, cinco o más) de ruptura destructiva de proteasa. Cuando se incluye más de un sitio de ruptura destructiva, los sitios de ruptura pueden ser iguales o diferentes. A este respecto, el uso de más de un sitio de ruptura destructiva proporciona una desactivación apartada mejorada. De forma similar, el uso de dos o más sitios de ruptura destructiva proporciona una flexibilidad de diseño adicional.

10 El(los) sitio(s) de ruptura destructiva puede(n) diseñarse en cualquiera de los siguientes componentes del polipéptido: el componente de proteasa no citotóxica, el componente de traslocalización, el resto dirigido a diana, o el péptido espaciador (si está presente). A este respecto, el(los) sitio(s) de ruptura destructiva se elige(n) para asegurar un efecto adverso mínimo sobre la potencia del polipéptido (por ejemplo, presentando un efecto mínimo sobre las regiones dirigidas a diana/ de unión y/ o el dominio de traslocalización, y/ o sobre el dominio de proteasa no citotóxica) a la vez que se asegura que el polipéptido es lábil lejos de su sitio diana/ célula diana.

15 Los sitios de ruptura destructiva preferidos (más las correspondientes proteasas) se presentan en la Tabla mostrada inmediatamente debajo. Los sitios de ruptura enumerados son puramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

Segunda proteasa	Secuencia de reconocimiento de sitio de ruptura destructiva	Varianza de secuencia de reconocimiento tolerada P4-P3-P2-P1-▼-P1'-P2'-P3'						
		P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
Trombina	LVPR▼GS	A,F,G,I, L,T,V o M	A,F,G, ,I,L,T, V,W o A	P	R	No D o E	No D o E	---
Trombina	GR▼G			G	R	G		
Factor Xa	IEGR▼	A,F,G,I, L,T,V o M	D o E	G	R	---	---	---
ADAM17	PLAQA▼VRSSS							
Proteasa de tipo tripsina de vías respiratorias humana (HAT)	SKGR▼SLIGRV							
ACE (peptidil-dipeptidasa A)		---	---	---	---	No P	No D o E	N /A
Elastasa (leucocito)	MEA▼VTY	M, R	E	A, H	V, T	V, T, H	Y	---
Furina	RXR/KR▼	R	X	R o K	R			
Granzima	IEPD▼	I	E	P	D	---	---	---
Caspasa 1		F,W,Y, L	---	H, A,T	D	No P,E,D, Q,K o R	---	---
Caspasa 2	DVAD▼	D	V	A	D	No P,E,D, Q,K o R	---	---

Segunda proteasa	Secuencia de reconocimiento de sitio de ruptura destructiva	Varianza de secuencia de reconocimiento tolerada P4-P3-P2-P1-▼ -P1'-P2'-P3'						
		P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
Caspasa 3	DMQD▼	D	M	Q	D	No P,E,D, Q,K o R	---	---
Caspasa 4	LEVD▼	L	E	V	D	No P,E,D, Q,K o R	---	---
Caspasa 5		L o W	E	H	D	---	---	--
Caspasa 6		V	E	H o I	D	No P,E,D. Q.K o R	---	---
Caspasa 7	DEVD▼	D	E	V	D	No P,E,D. Q.K o R	---	---
Caspasa 8		I o L	E	T	D	No P,E,D. Q.K o R	---	---
Caspasa 9	LEHD▼	L	E	H	D	---	---	---
Caspasa 10	IEHD▼	I	E	H	D	---	---	---

5 Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son un grupo preferido de proteasas destructivas en el contexto de la presente invención. Dentro de este grupo, se prefiere ADAM17 (EC 3.4.24.86, también conocida como TACE) y actúa rompiendo una variedad de proteínas de superficie celular ancladas a membrana para “mudar” los dominios extracelulares. Otras MMPs adicionales preferidas incluyen adamalinas, serralinas y astacinas.

Otro grupo de proteasas destructivas preferidas es una proteasa sanguínea de mamífero, tal como la Trombina, el Factor de Coagulación VIIa, el Factor de Coagulación IXa, el Factor de Coagulación Xa, el Factor de Coagulación XIa, el Factor de Coagulación XIIa, Calicreína, Proteína C y serina proteasa asociada a MBP.

10 En una realización de la presente invención, dicho sitio de ruptura destructiva comprende una secuencia de reconocimiento que tiene al menos 3 ó 4, preferiblemente 5 ó 6, más preferiblemente 6 ó 7, y de forma particularmente preferible al menos 8 residuos de aminoácido contiguos. En este aspecto, cuanto más larga es la secuencia de reconocimiento (en términos de residuos de aminoácido contiguos), menos probable es que se produzca una ruptura no específica del sitio destructivo por una segunda proteasa no pretendida.

15 Es preferible que el sitio de ruptura destructiva de la presente invención se introduzca en el componente de proteasa y/ o el Resto dirigido a diana y/ o el componente de traslocalización y/o el péptido espaciador. De estos cuatro componentes, se prefiere el componente de proteasa. Por consiguiente, el polipéptido puede desactivarse rápidamente por una destrucción directa de la proteasa no citotóxica y/o por unión y/ o componentes de traslocalización.

Administración de polipéptidos

20 Para su uso, la presente invención emplea una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido, junto con al menos un componente seleccionado de un vehículo, excipiente, adyuvante, propelente y/ o sal farmacéuticamente aceptable.

25 Los polipéptidos de la presente invención pueden formularse para aplicación oral, parenteral, por infusión continua, por implante, por inhalación o tópica. Las composiciones adecuadas para inyección pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones o emulsiones, o de polvos seco que se disuelve o suspende en un vehículo adecuado antes del uso.

Los medios de administración local pueden incluir un aerosol, u otro pulverizador (p.ej., un nebulizador). En este aspecto, una formulación de aerosol de un polipéptido permite la administración a los pulmones y/o a otras vías bronquiales o respiratorias.

5 La ruta de administración preferida se selecciona entre: sistémica (p.ej., iv), laparoscópica y/ o inyección localizada (por ejemplo, inyección transfenoidal directamente en el tumor).

10 En el caso de formulaciones para inyección, es opcional incluir una sustancia farmacéuticamente activa para ayudar en la retención o para reducir la eliminación del polipéptido del sitio de administración. Un ejemplo de dicha sustancia farmacéuticamente activa es un vasoconstrictor tal como la adrenalina. Una formulación así confiere la ventaja de aumentar el tiempo de residencia del polipéptido después de la administración y, por tanto, de esta manera aumentar y/o potenciar su efecto.

15 Los rangos de dosis para la administración de polipéptidos de la presente invención son aquellos que produzcan el efecto terapéutico deseado. Cabe destacar que el rango de dosis requerido depende de la naturaleza precisa del polipéptido o de la composición, de la ruta de administración, de la naturaleza de la formulación, de la edad del paciente, de la naturaleza, extensión o gravedad de la afección del paciente, de contraindicaciones, si las hay, y del criterio del médico responsable. Las variaciones de dichos niveles de dosis se pueden ajustar usando rutinas empíricas estándares para la optimización.

20 Las dosis diarias adecuadas (por kg de peso del paciente) se encuentran en el rango de 0,0001-1 mg/kg, preferiblemente de 0,0001-0,5 mg/kg, más preferiblemente de 0,002-0,5 mg/kg y de forma particularmente preferible de 0,004-0,5 mg/kg. La dosis unitaria puede variar desde menos de 1 microgramo hasta 30 mg, pero habitualmente estará en la región de 0,01 a 1 mg por dosis, que puede administrarse diariamente o preferiblemente de forma menos frecuente, tal como semanalmente o seis veces al mes.

Un régimen de dosificación particularmente preferido se basa en 2,5 ng de polipéptido como dosis 1X. En este aspecto, las dosis preferidas se encuentran en el rango de 1X-100X (es decir, 2,5-250 ng).

25 Las formas de dosis fluidas se preparan típicamente utilizando el polipéptido y un vehículo estéril libre de pirógenos. El polipéptido, dependiendo del vehículo y de las concentraciones usadas, puede disolverse o suspenderse en el vehículo. Al preparar las disoluciones, el polipéptido se puede disolver en el vehículo, haciendo la disolución isotónica si es necesario mediante la adición de cloruro sódico y esterilizando mediante filtración a través de un filtro estéril usando técnicas asépticas antes de ser llevadas a viales o ampollas estériles adecuadas y de sellar. Alternativamente, si la estabilidad de la disolución es adecuada, la disolución en sus recipientes sellados puede ser esterilizada mediante autoclavado. De forma ventajosa se pueden disolver en el vehículo aditivos tales como agentes tamponantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes o bactericidas, agentes de suspensión o emulsionantes y/ o agentes anestésicos locales.

30 El polvo seco, que se disuelve o se suspende en un vehículo adecuado antes de su uso, puede prepararse rellenando los ingredientes esterilizados previamente en un recipiente estéril usando técnicas asépticas en un área esterilizada. Alternativamente, los ingredientes se pueden disolver en recipientes adecuados usando técnicas asépticas en un área esterilizada. A continuación es producto es secado por congelación y los recipientes se sellan asépticamente.

35 Las suspensiones parenterales, adecuadas para inyección intramuscular, subcutánea o intradérmica, se preparan sustancialmente de la misma manera, exceptuando que los componentes estériles son suspendidos en el vehículo estéril, en lugar de estar disueltos, y la esterilización no se puede llevar a cabo por filtración. Los componentes pueden aislarse en estado estéril o, alternativamente, pueden esterilizarse tras el aislamiento, p.ej., mediante irradiación gamma.

De forma ventajosa, se incluye un agente de suspensión, por ejemplo polivinilpirrolidona, en la(s) composición(es) para facilitar una distribución uniforme de los componentes.

45 **Sección de definiciones**

El resto dirigido a diana (TM, del inglés "Targeting Moiety") según se define en las reivindicaciones significa cualquier estructura química que interacciones funcionalmente con un sitio de unión para producir una asociación física entre el polipéptido de la invención y la superficie de la célula diana (típicamente una célula de mamífero, especialmente una célula humana). El término TM abarca cualquier molécula (es decir, una molécula natural o una variante modificada químicamente/físicamente de la misma) que sea capaz de unirse a un sitio de unión sobre la célula diana, sitio de unión que es capaz de internalización (p.ej., formación de endosoma) – también denominada endocitosis mediada por receptor. El TM puede poseer una función de traslocalización de membrana endosomal, en cuyo caso no es necesario que estén presentes los componentes TM y de dominio de traslocalización separados en un agente de la presente invención. A lo largo de la descripción precedente, se han descrito TMs específicos. La referencia a dichos TMs es meramente ilustrativa, y abarca todas las variantes y derivados de los mismos, que posean una capacidad de unión básica (es decir, de ataque a diana) a un sitio de unión localizado en la célula tumoral neuroendocrina, en donde el sitio de unión es capaz de internalización.

El TM de la presente invención se une (preferiblemente se une específicamente) a la célula diana en cuestión. El término "se une específicamente" preferiblemente significa que un TM dado se une a la célula diana con una afinidad de unión (Ka) de 10^6 M^{-1} o superior, preferiblemente de 10^7 M^{-1} o superior, o de 10^8 M^{-1} o superior, o de 10^9 M^{-1} o superior. Los TMs de la presente invención (cuando se encuentran en forma libre, es decir cuando están separados de cualquier componente de proteasa y/ o de traslocalización), preferiblemente presentan una afinidad de unión (IC_{50}) por el receptor diana en cuestión en el rango de 0,05-18 nM.

El TM de la presente invención preferiblemente no es aglutinina de germen de trigo (WGA).

La referencia a TM en la presente especificación abarca los fragmentos y variantes del mismo que retienen la capacidad de unirse a la célula diana en cuestión. A modo de ejemplo, una variante puede tener una homología de secuencia de aminoácidos de al menos el 80%, preferiblemente de al menos el 90%, más preferiblemente de al menos el 95% y lo más preferiblemente de al menos el 97 o al menos el 99% con respecto al TM de referencia – este último es cualquier secuencia de TM mencionada en la presente solicitud. Por tanto, una variante puede incluir uno o más análogos de un aminoácido (p.ej., un aminoácido no natural), o un enlace sustituido. Asimismo, a modo de ejemplo, el término fragmento, cuando se usa en relación a un TM, significa un péptido que tiene al menos cinco, preferiblemente al menos diez, más preferiblemente al menos veinte, y lo más preferiblemente al menos veinticinco residuos de aminoácido del TM de referencia. El término fragmento también se refiere a las variantes mencionadas anteriormente. De esta manera, a modo de ejemplo, un fragmento de la presente invención puede comprender una secuencia de péptido que tiene al menos 7, 10, 14, 17, 20, 25, 28, 29 ó 30 aminoácidos, en donde la secuencia de péptido tiene una homología de secuencia de al menos el 80% con respecto a la correspondiente secuencia de péptido de aminoácidos (contiguos) del péptido de referencia.

La somatostatina (SST) y la cortistatina (CST) tienen una elevada homología estructural, y se unen a todos los receptores de SST conocidos. La SST de longitud completa presenta la secuencia de aminoácidos:

MLSCRLQCALAALSIVLALGCVTGAPSDPRLRQFLQKSLAAAAGKQELAKYF
LAELLSEPNQTENDALEPEDLSQAAEQDEMRLQLRSANSNPAMAPRERKA
GCKNFFWKTF TSC

La CST de longitud completa presenta la secuencia de aminoácidos:

MYRHKNSWRLGLKYPPSSKEETQVPKTLISGLPGRKSSSRVGEKLQSAHKM
PLSPGLLLLLLSGATATAALPLEGGPTGRDSEHMQEAAAGIRKSSLLTFLAWW
FEWTSQASAGPLIGEEAREVARRQEGAPPQQSARRDRMPCRNFFWKTFSS

CK

La referencia a estos TMs incluye los siguientes fragmentos de los mismos (y las correspondientes variantes):

NFFWKTF;

(R o K)NFFWKTF;

C(R o K)NFFWKTF;

(P o G)C(R o K)NFFWKTF;

NFFWKTF(S o T);

NFFWKTF(S o T)S;

NFFWKTF(S o T)SC;

(R o K)NFFWKTF(S o T);

(R o K)NFFWKTF(S o T)S;

(R o K)NFFWKTF(S o T)SC;

C(R o K)NFFWKTF(S o T);

C(R o K)NFFWKTF(S o T)S;

C(R o K)NFFWKTF(S o T)SC;

(P o G)C(R o K)NFFWKTF(S o T);

(P o G)C(R o K)NFFWKTF(S o T)S; o

(P o G)C(R o K)NFFWKTF(S o T)C.

5 En relación a las anteriores secuencias, cuando se proporciona una alternativa (P ó G), es preferible P en el caso de un TM de CST, mientras que se prefiere G en el caso de un TM de SST. Cuando se proporciona una alternativa (R o K), es preferible R para el caso de un TM de CST, mientras que para el caso de un TM de SST se prefiere K. Cuando se proporciona una alternativa (S o T), es preferible S para el caso de un TM de CST, mientras que para el caso de un TM de SST se prefiere T.

10 Los fragmentos preferidos comprenden al menos 7 o al menos 10 residuos de aminoácido, preferiblemente al menos 14 o al menos 17 residuos de aminoácido, y más preferiblemente al menos 28 ó 29 residuos de aminoácido. A modo de ejemplo, las secuencias preferidas incluyen: SANSNPAMAPRERKAGCKNFFWKTFSTSC (SST-28); AGCKNFFWKTFSTSC (SST-14); QEGAPPQQSARRDRMPCRNFFWKTFSSCK (CST-29); QERPLQQPPHRDKKPKCNFFWKTFSSCK (CST-29); QERPPPQQPPHLDKKPKCNFFWKTFSSCK (CST-29); DRMPCRNFFWKTFSSCK (CST-17); PCRNFFWKTFSSCK (CST-14) y PCKNFFWKTFSSCK (CST-14).

15 El TM puede comprender una secuencia de aminoácidos más larga, por ejemplo, de al menos 30 ó 35 residuos de aminoácido, o de al menos 40 ó 45 residuos de aminoácido, siempre que el TM sea capaz de unirse a una célula tumoral neuroendocrina, preferiblemente a un receptor de SST o de CST de una célula tumoral neuroendocrina. A este respecto, el TM preferiblemente es un fragmento de SST o CST de longitud completa, aunque incluyendo al menos la secuencia de núcleo "NFFWKTF" o una de las secuencias de aminoácido primarias definidas anteriormente.

20 Los péptidos GHRH de la presente invención incluyen:

YADAIFTASYRKVLGQLSARKLLQDILSR; YADAIFTASYRNVLGQLSARKLLQDILSR;
 YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIM; YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMS;
 ADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSR;
 YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGARARL;
 YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGA;
 YADAIFTNAYRKVLGQLSARKLLQDIMSR; YADAIFTNSYRKVLGQLSARKALQDIMSR;
 YADAIFTASYKKVLGQLSARKLLQDIMSR; YADAIFTASYKRVLGQLSARKLLQDIMSR;
 YADAIFTASYNKVLGQLSARKLLQDIMSR; YADAIFTASYRKVLGQLSARKLLQDIMSR;
 YADAIFTASYKKVLGQLSARKLLQDIMSR; YADAIFTASYRKVLGQLSARKLLQDIMSR;
 YADAIFTASYRNVLGQLSARKLLQDIMSR; YADAIFTASYRKVLGQLSARNLLQDIMSR;
 YADAIFEASYRKVLGQLSARKLLQDIMSR; YADAIFTASERKVLGQLSARKLLQDIMSR;
 YADAIFTASYRKELGQLSARKLLQDIMSR; YADAIFTASYRKVLGQLSARKLLQDIMSR;
 YADAIFTESYRKVLGQLSARKLLQDIMSR; YADAIFTNSYRKVLAQLSARKLLQDIM;
 YADAIFTNSYRKVLAQLSARKLLQDIMSR; YADAIFTASYRKVLAQLSARKLLQDIMSR;
 YADAIFTAAYRKVLAQLSARKALQDIASR; YADAIFTAAYRKVLAQLSARKALQDIMSR;
 HVDAIFTQSYRKVLAQLSARKLLQDILNRQQGERNQEQGA;
 HVDAIFTQSYRKVLAQLSARKALQDILSRQQG; HVDAIFTSSYRKVLAQLSARKLLQDILSR;
 HVDAIFTTSYRKVLAQLSARKLLQDILSR; YADAIFTQSYRKVLAQLSARKALQDILNR;
 YADAIFTQSYRKVLAQLSARKALQDILSR.

25 La confirmación de que un TM se une a la célula diana seleccionada es rutinaria. Por ejemplo, se puede emplear un experimento sencillo de desplazamiento radioactivo en el que el tejido o las células representativas de una célula tumoral neuroendocrina son expuestos a TM marcado (p.ej., tritiado) en presencia de un exceso de TM no marcado. En dicho experimento, se pueden determinar las proporciones relativas de unión no específica y unión específica, permitiendo de este modo la confirmación de si el TM se une a la célula diana. Opcionalmente, el ensayo puede incluir uno o más antagonistas de unión, y el ensayo puede comprender además la observación de una pérdida de unión de TM. Los ejemplos de este tipo de experimento se pueden encontrar en Hulme, E.C. (1990), "Receptor-binding studies, a brief outline", pág. 303-311, en "Receptor biochemistry, A Practical Approach", Ed. E.C. Hulme, Oxford University Press.

30 En el contexto de la presente invención, la referencia a un péptido TM (p.ej., un péptido GHRH) abarca los péptidos análogos del mismo, siempre que el TM análogo se una al mismo receptor que el TM de "referencia" correspondiente. Dichos análogos pueden incluir residuos sintéticos tales como: β -Nal = β -naftilalanina; β -Pal = β -

piridilalanina; hArg(Bu) = N-guanidino-(butil)-homoarginina; hArg(Et)₂ = N, N'-guanidino-(dimetil)-homoarginina; hArg(CH₂CF₃)₂ = N, N-guanidino-bis-(2,2,2-trifluoroetil)-homoarginina; hArg(CH₃, hexil) = N, N-guanidino-(metil, hexil)-homoarginina; Lys(Me) = N^ε-metilisinina; Lys(iPr) = N^ε-isopropilisinina; AmPhe = aminometilfenilalanina; AChxAla = aminociclohexilalanina; Abu = ácido α-aminobutírico; Tpo = 4-tiaprolinina; MeLeu = N-metilleucina; Orn = ornitina; Nle = norleucina; Nva = norvalina; Trp(Br) = 5-bromo-triptófano; Trp(F) = 5-fluoro-triptófano; Trp(NO₂) = 5-nitro-triptófano; Gaba = ácido γ-aminobutírico; Bmp = J-mercaptopropionilo; Ac = acetilo; y Pen = pencillamina.

El aspecto del péptido análogo anterior se describe con más detalle en referencia a péptidos TMs específicos, tal como los péptidos de SST, los péptidos de GHRH, los péptidos de bombesina, los péptidos de grelina, GnRH (también conocidos como péptidos LHRH), y los péptidos de urotensina.

- 10 Los análogos de somatostatina incluyen los descritos en las siguientes publicaciones: Van Binst, G. et al. Peptide Research 5: 8 (1992); Horvath, A. et al. Abstract, "Conformations of Somatostatin Analogs Having Antitumor Activity", 22nd European peptide Symposium, 13-19 de septiembre, 1992, Interlaken, Suiza; US5.506.339; EP0363589; US4.904.642; US4.871.717; US4.725.577; US4.684.620; US4.650.787; US4.585.755; US4.725.577; US4.522.813; US4.369.179; US4.360.516; US4.328.214; US4.316.890; US4.310.518; US4.291.022; US4.238.481; US4.235.886; 15 US4.211.693; US4.190.648; US4.146.612; US4.133.782; US5.506.339; US4.261.885; US4.282.143; US4.190.575; US5.552.520; EP0389180; EP0505680; US4.603.120; EP0030920; US4.853.371; WO90/12811; WO97/01579; WO91/18016; WO98/08529 y WO98/08528; WO/0075186 y WO00/06185; WO99/56769; y FR 2.522.655.

- Los análogos preferidos incluyen: ciclo(N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe) o H-D-β-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; H-Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH₂; H-Cys-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH₂; H-Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys-NH₂; H-Cys-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH₂; H-Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-NH₂; H-Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH₂; H-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-NH₂; H-D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; H-Cys-Phe-Tyr(l)-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH₂; H-D-Phe-p-cloro-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; H-D-Phe-p-NO₂-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; H-D-β-Nal-p-cloro-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; H-D-Phe-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; H-D-Phe-p-cloro-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; H-D-Phe-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Ala-D-β-Nal-NH₂; H-D-β-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-β-Nal-NH₂; H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-β-Nal-NH₂; H-D-β-Nal-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Pen-Thr-NH₂; H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Pen-Thr-NH₂; H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Pen-Thr-OH; H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Pen-Thr-OH; H-Gly-Pen-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH; H-Phe-Pen-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH; H-Phe-Pen-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Pen-Thr-OH; H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol; H-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; H-D-Trp-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; H-D-Trp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; Ac-D-Phe-Lys*-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Asp*-Thr-NH₂ (un puente de amida formado entre Lys* y Asp*); Ac-hArg (Et) 2-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; Ac-D-hArg (Et) 2-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; Ac-D-hArg (Bu)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; Ac-D-hArg (Et) 2-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; Ac-L-hArg (Et) 2-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; Ac-D-hArg (CH₂CF₃) 2-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; Ac-D-hArg (CH₂CF₃) 2-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Phe-NH₂; Ac-D-hArg (CH₂CF₃) 2-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NHEt; Ac-L-hArg (CH₂-CF₃) 2-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; Ac-D-hArg (CH₂CF₃) 2-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys (Me)-Thr-Cys-Thr-NH₂; Ac-D-hArg (CH₂CF₃) 2-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys (Me)-Thr-Cys-Thr-NHEt; Ac-hArg (CH₃, hexil)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; H-hArg (hexil₂)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; Ac-D-hArg (Et) 2-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NHEt; Ac-D-hArg (Et) 2-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Phe-NH₂; Propionil-D-hArg (Et) 2-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys (iPr)-Thr-Cys-Thr-NH₂; Ac-D-β-Nal-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Gly-hArg (Et) 2-NH₂; Ac-D-Lys (iPr)-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; Ac-D-hArg (CH₂CF₃) 2-D-hArg (CH₂CF₃) 2-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; Ac-D-hArg (CH₂CF₃) 2-D-hArg (CH₂CF₃) 2-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Phe-NH₂; Ac-D-hArg (Et) 2-D-hArg (Et) 2-Gly-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; c-Cys-Lys-Asn-4-Cl-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-D-Cys-NH₂; H-Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; H-Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Phe-NH₂; H-Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-p-Cl-Phe-NH₂; H-Bmp-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-p-Nal-NH₂; H-D-β-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂; H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-beta-Nal-NH₂; H-pentafluoro-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-p-Nal-NH₂; H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-β-Nal-NH₂; H-D-, SNal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂; H-D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂; Ac-D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys-Thr-NH₂; H-D-Phe-Cys-p-Nal-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH₂; ciclo (Pro-Phe-D-Trp-N-Me-Lys-Thr-Phe); ciclo (Pro-Phe-D-Trp-N-Me-Lys-Thr-Phe); ciclo (Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-N-Me-Phe); ciclo (Pro-Phe-L-Trp-Lys-Thr-Phe); ciclo (Pro-Phe-D-Trp (F)-Lys-Thr-Phe); ciclo (Pro-Phe-Trp (F)-Lys-Thr-Phe); ciclo (Pro-Phe-D-Trp-Lys-Ser-Phe); ciclo (Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-p-Cl-Phe); ciclo (D-Ala-N-Me-D-Phe-D-Thr-D-Lys-Trp-D-Phe); ciclo (D-Ala-N-Me-D-Phe-D-Val-Lys-D-Trp-D-Phe); ciclo (D-Ala-N-Me-D-Phe-D-Thr-Lys-D-Trp-D-Phe); ciclo (D-Abu-N-Me-D-Phe-D-Val-Lys-D-Trp-D-Tyr); ciclo (Pro-Tyr-D-Trp-t-4-AchxAla-Thr-Phe); ciclo (Pro-Phe-D-Trp-t-4-AchxAla-Thr-Phe); ciclo (N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe); ciclo (N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-t-4-AchxAla-Thr-Phe); ciclo (Pro-Tyr-D-Trp-4-Amphe-Thr-Phe); ciclo (Pro-Phe-D-Trp-4-Amphe-Thr-Phe); ciclo (N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-4-Amphe-Thr-Phe); ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba); ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba-Gaba); ciclo (Asn-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe); ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-NH (CH₂) 4CO); ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-

Lys-Thr-Phe->Ala); ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-D-Glu)-OH; ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe); ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gly); ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba); ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gly); ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp (F)-Lys-Thr-Phe-Gaba); ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp (NO₂)-Lys-Thr-Phe-Gaba); ciclo (Asn-Phe-Phe-Trp (Br)-Lys-Thr-Phe-Gaba); ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe (I)-Gaba); ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Tyr (But)-Gaba); ciclo (Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Pro-Cys)-OH; ciclo (Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Pro-Cys)-OH; ciclo (Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Tpo-Cys)-OH; ciclo (Bmp-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-MeLeu-Cys)-OH; ciclo (Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Phe-Gaba); ciclo (Phe-Phe-D-Trp (5F)-Lys-Thr-Phe-Phe-Gaba); ciclo (Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys (Ac)-Thr-Phe-NH-(CH₂)₃-CO); ciclo (Lys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba); ciclo (Lys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba); ciclo (Orn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Gaba); H-Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH₂; H-Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys-NH₂; H-Cys-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH₂; H-Cys-Phe-Tyr (I)-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys-NH₂.

Los métodos para sintetizar análogos están bien documentados, tal como se ilustra, por ejemplo, en las patentes citadas anteriormente. Por ejemplo, la síntesis de H-D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂ se puede lograr siguiendo el protocolo establecido en el Ejemplo 1 de la patente EP0395417A1. De forma similar, la síntesis de análogos con un extremo N sustituido se puede lograr, por ejemplo, siguiendo el protocolo establecido en las patentes WO88/02756, EP0329295 y US5.240.561.

Los ejemplos preferidos de análogos lineales incluyen: H-D-Phe-p-cloro-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; H-D-Phe-p-NO₂-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; H-D-*Nal-p-cloro-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; H-D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; H-D-Phe-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; H-D-Phe-p-cloro-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; y H-D-Phe-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Ala-D-beta-Nal-NH₂.

Uno o más restos químicos, p.ej., un derivado de azúcar, grupos mono o poli-hidroxilalquilo (C₂-12), mono o poli-hidroxiacilo (C₂-12), o un derivado de piperacina, pueden unirse a un análogo de SST, p.ej., al aminoácido del extremo N – véanse las patentes WO88/02756, EP0329295 y US5.240.561.

Ejemplos adicionales de análogos de SST incluyen los siguientes: D-Cpa-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂; D-Phe-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂; D-Phe-ciclo[Cys-p-NH₂-Phe-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂; N-Me-D-Phe-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂; D-Phe-ciclo[Cys-Tyr-D-Pal-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂; Ac-D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂; D-Phe-ciclo [Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Nal-NH₂; D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Nal-NH₂; D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-OH; ED-Phe-ciclo[Cys-Nal-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂; D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Nal-Lys-Val-Cys]-Nal-NH₂; D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-D-Cys]-Nal-NH₂; D-Trp-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Nal-NH₂; D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-D-Nal-NH₂; Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-D-Nal-NH₂; (AcO-CH₂)₃-C-NH-CO-(CH₂)₂-CO-D-Nal-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys)-Thr-NH₂; [3-O-(2,5,6-triacetil ascórbico)acetil-D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂; D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Trp-NH₂; Phe-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Trp-NH₂; 3-O-(ascórbico)butiril-D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂; 3-O-(ácido ascórbico)Ac-D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂; D-Bpa-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Nal-NH₂; D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Bpa-NH₂; Tris-Suc-D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂; D-Dpa-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Nal-NH₂; D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Dpa-NH₂; Ac-D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂; ciclo-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂; NmeCpa-ciclo (DCys-3-Pal-DTrp-Lys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo(NMeDCys-3-Pal-DTrp-Lys-Thr-Cys)-2-Nal-NHMe; Cpa-ciclo (DCys-NMe3-Pal-DTrp-Lys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo(DCys-3-Pal-NMeDTrp-Lys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo(DCys-3-Pal-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo(DCys-3-Pal-DTrp-Lys-NMeThr-Cys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo (DCys-3-Pal-DTrp-Lys-Thr-NMeCys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo (DCys-3-Pal-DTrp-Lys-Thr-Cys)-Nme2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo(NMeDCys-3-Pal-DTrp-Lys-Thr-Cys)-Dip-NHMe; Cpa-ciclo (DCys-3-Pal-NMeDTrp-NMeLys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo(DCys-Tyr-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; Tfm-ciclo (DCys-3-Pal-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo(DCys-3-Pal-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-DTrp-NH₂; Nal-ciclo (DCys-3-Pal-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-DTrp-NH₂; 3-Pal-ciclo (DCys-3-Pal-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-DTrp-NH₂; NmeCpa-ciclo (DCys-3-Pal-DTrp-Lys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo(DCys-3-Pal-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo(DCys-Tyr-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; o 3-Pal-ciclo(DCys-3-Pal-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-DTrp-NH₂; NmeCpa-ciclo (DCys-3-Pal-DTrp-Lys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo(DCys-3-Pal-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo (DCys-3-Pal-NMeDTrp-NMeLys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo (DCys-Tyr-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; o Cpa-ciclo(DCys-3-Pal-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-DTrp-NH₂; Cpa-ciclo (DCys-3-Pal-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; Cpa-ciclo(DCys-Tyr-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-2-Nal-NH₂; ácido metilpropiónico-Tyr-D-Trp-ys-Val-Cys-Thr-NH₂; ácido metilpropiónico -Tyr-D-Trp-ys-Val-Cys-Phe-NH₂; ácido metilpropiónico -Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-p-Cl-Phe-NH₂; ácido metilpropiónico -Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-β-Nal-NH₂; D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; D-Phe-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; D-Phe-p-cloro-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; o D-Phe-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Ala-β-D-Nal-NH₂; H₂-c[Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[D-Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[Cys-Phe-Trp-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, o H₂-c[Cys-Phe-Tyr(I)-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[Cys-Phe-Trp-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[D-Cys-Phe-Trp-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[Cys-Phe-His-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[D-Cys-Phe-His-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[D-Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[D-Cys-Phe-Trp-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[Cys-Phe-His-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[D-Cys-Phe-His-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[D-Cys-Phe-Tyr(I)-D-Trp-Lys-Thr-

Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[Cys-Phe-Tyr(l)-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, o H₂-c[D-Cys-Phe-Tyr(l)-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[D-Cys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[Cys-Asn-Phe-Trp-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c [D-Cys-Asn-Phe-Trp-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c [Cys-Asn-Phe-His-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[D-Cys-Asn-Phe-His-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[Cys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[D-Cys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[Cys-Asn-Phe-Trp-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[D-Cys-Asn-Phe-His-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c [Cys-Asn-Phe-Tyr(l)-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c [D-Cys-Asn-Phe-Tyr(l)-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c [Cys-Asn-Phe-Tyr(l)-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c [D-Cys-Asn-Phe-Tyr(l)-D-Trp-Lys-Ser-Phe-Cys]-NH₂, H₂-c[Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH₂; Ac-D-Phe-Tyr-ciclo (D-Cys-D-Trp-Lys-Cys)-Abu-Thr-NH₂; Nal-Tyr-ciclo(Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Val-Nal-NH₂; Nal-Tyr-ciclo(Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Abu-Nal-NH₂; D-Dip-Tyr-ciclo(Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Abu-Nal-NH₂; Dip-Tyr-ciclo (D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Abu-Nal-NH₂; Nal-Tyr-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Abu-Nal-NH₂; Dip-Tyr-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Val-Nal-NH₂; Nal-Tyr-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Val-Nal-NH₂; ciclo(D-Phe-Tyr-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-Cys)-Abu-Thr); Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-A3c-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-A5c-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-A6c-Nal-NH₂; (G(z))aeg-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-A5c-Nal-NH₂; Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-A5c-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-β-Ala-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Sar-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Gaba-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Pro-Nal-NH₂; Pro-Phe-c(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Nle-Phe-NH₂; Pro-Phe-c(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr-Nle-NH₂; Pro-Phe-c (D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr-Phe-NH₂; Cpa-Phe-c (D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Gaba-NH₂ ; Cpa-Phe-c(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Gaba-Tyr-NH₂; Pip-Phe-c (D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-NH₂; Pip-Phe-c (Cys-D-Trp-Lys-Cys)-Gaba-NH₂; o Pro-Phe-c(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr-NH₂; Phe-ciclo(Cys-D-Trp-Lys-Cys)-Thr-NH₂; Phe-Tyr-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-Cys)-Abu-Thr-NH₂; Ac-D-Phe-Tyr-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-Cys)-Abu-Thr-NH₂; Nal-Tyr-ciclo(Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Val-Nal-NH₂; Nal-Tyr-ciclo(Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Abu-Nal-NH₂; Dip-Tyr-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Abu-Nal-NH₂; Dip-Tyr-ciclo (D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Val-Nal-NH₂; Nal-Tyr-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Val-Nal-NH₂, Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-A3c-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-A5c-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-A6c-Nal-NH₂; (G(z))aeg-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-A5c-Nal-NH₂; D-Cpa-ciclo(Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-A5c-Nal-NH₂; Pal-ciclo (D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-A5c-Nal-NH₂; Cpa-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-A5c-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-β-Ala-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Sar-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Aic-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Gaba-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Pro-Nal-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-(A)aeg-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-A4c-Nal-NH₂; Cpa-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Nal-NH₂; Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Nal-NH₂; Pro-Phe-ciclo(Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Val-NH₂; Pro-Phe-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-Cys)-Val-NH₂; Pip-4-NO₂-Phe-ciclo(D-cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Nle-NH₂; (G)aeg-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-(C)aeg-NH₂; or (C)aeg-Pal-ciclo(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr (Bzl)-(G)aeg-NH₂; Nal-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Nal-NH₂; D-Nal-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Nal-NH₂; D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Thr-NH₂; D-4-NO₂-Phe-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Nal-NH₂; Ac-D-4-NO₂-Phe-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Nal-NH₂; D-4-NO₂-Phe-Pal-ciclo(D-Cys-Phe (4-O-Bzl)-D-Trp-Lys-Cys)-Tyr-NH₂; Cpa-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; D-4-NO₂-Phe-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr-Tyr-NH₂; D-4-NO₂-Phe-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-NH₂; D-4-NO₂-Phe-ciclo (D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; D-4-NO₂-Phe-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; 4-NO₂-Phe-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; D-Nal-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; Pro-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; Cpa-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Nal-NH₂; Ser(Bzl)-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (A)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (G)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-4-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-(T)aeg-D-Trp-Lys-Cys)-Thr (Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Ser(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Phe(4-O-Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-A5c-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Abu-Tyr-NH₂; D-Cpa-ciclo(D-Cys-(T)aeg-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (C)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; D-Cpa-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(Pen-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Trp-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Orn-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-hLys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-lamp-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Cha(4-am)-D-Cys) Thr (Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Ser(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-D-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys) Thr (Bzl)-Trp-NH₂; (T) aeg-c (D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Pen)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (C)aeg-c(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; Ina-c(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; Mnf-c(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; Inp-c(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-D-Cys)-thr(Bzl)-Tyr-NH₂; Nua-c(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-Pal-c(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-Pal-c(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)Tyr(Bzl)-Thr-NH₂; (C)aeg-Phe-c(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys) Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; or (T)aeg-D-Trp-c(D-Cys-Pal-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Leu-NH₂; Hca-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Nal-NH₂; Ac-Nal-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Nal-NH₂; Ac-D-Phe-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Nal-NH₂; Ac-D-Nal-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Nal-NH₂; D-Phe-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Nal-NH₂; D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Thr-NH₂; D-4-NO₂-Phe-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Nal-NH₂; Ac-D-4-NO₂-Phe-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Nal-NH₂; D-4-NO₂-Phe-Pal-ciclo(D-Cys-Phe(4-O-Bzl)-D-Trp-Lys-Cys)-Tyr-NH₂; D-4-NO₂-Phe-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; Cpa-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; D-4-NO₂-Phe

ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-NH₂; D-4-NO₂-Phe-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr (Bzl)-Tyr-NH₂; D-4-NO₂-Phe-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; 4-NO₂-Phe-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; D-Nal-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr (Bzl)-Tyr-NH₂; Pro-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; Cpa-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Nal-NH₂; Ser(Bzl)-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (C)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; Aic-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (C(z))aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (A(z))aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (A) aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (G)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-4-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Thr (Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Ser(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Phe(4-O-Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-A5c-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Cys)-Abu-Tyr-NH₂; D-Cpa-ciclo(D-Cys-(T)aeg-D-Trp-Lys-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-p-Me-Phe-NH₂; Ac-(T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Nal-NH₂; D-Cpa-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Nal-NH₂; (A)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (C)aeg-ciclo(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (C)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; D-Cpa-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(Pen-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Trp-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Orn-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-hLys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-lamp-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Cha(4-am)-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)-Ser(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr (Bzl)-D-Tyr-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Trp-NH₂; (T)aeg-c(D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-D-Pen)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (C)aeg-c(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; Ina-c(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; Mnf-c(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; Inp-c(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; Nua-c(D-Cys-Phe-D-Trp-Lys-D-Cys)-Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-Pal-c(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; (T)aeg-Pal-c(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)Tyr(Bzl)-Thr-NH₂; (C)aeg-Phe-c(D-Cys-D-Trp-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Tyr-NH₂; o (T)aeg-D-Trp-c(D-Cys-Pal-Lys-D-Cys)Thr(Bzl)-Leu-NH₂; ciclo(Trp-D-Trp-Lys-Phe(4-O-Bzl)-Phe-(T)aeg); ciclo(Trp-D-Trp-Lys-Pal-Phe-(T)aeg); ciclo(Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-(T)aeg); o H-β-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂ (también conocido como lanreotide) ciclo(Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe), ciclo(N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val- Phe); D-beta-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-a-ácido aminobutírico-Cys-Thr-NH₂; pentafluoro-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; N-Ac-D-beta-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; D-beta-Nal-Cys-pentafluoro-Phe-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; D-/3-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; D-Phe-Cys-3-Nal-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; D-beta-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-α-ácido aminobutírico-Cys-Thr-NH₂; D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-α-ácido aminobutírico-Cys-Thr-NH₂; acetil-D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-α-ácido aminobutírico-Cys-Thr-NH₂; ciclo(Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe); ciclo(N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe); D-beta-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH₂; D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol); D-p-Cl-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal; H2-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)(CH₃CO)-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)-(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilacetil)-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)-(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazineethanesulfonil)-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; H2-beta-Nal-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)(CH₃CO)-beta-Nal-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)-(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilacetil)-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; H2-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; (H)(CH₃CO)-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperizinaetanosulfonil)-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperizinaetanosulfonil)-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; (H)(CH₃CO)-beta-Nal-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilacetil)-beta-Nal-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Lys-Thr-NH₂; H2-Phe-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperizinaetanosulfonil)-Phe-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperizinaetanosulfonil)-Phe-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; H2-Phe-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)(CH₃CO)Phe-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilacetil)-Phe-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperizinaetanosulfonil)-Phe-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; (H)(CH₃CO)-Phe-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilacetil)-Phe-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperizinaetanosulfonil)-Phe-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂; H2-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilacetil)-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperizinaetanosulfonil)-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-beta-Nal-NH₂; H2-beta-Nal-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)(CH₃CO)-beta-Nal-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilacetil)-beta-Nal-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Cys-beta-Nal-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperizinaetanosulfonil)-beta-Nal-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Cys-beta-Nal-NH₂; H2-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; H(CH₃CO)-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; (H)(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperizinaetanosulfonil)-beta-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; H2-beta-Nal-D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂; (H)(CH₃CO)-

D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; (H)(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilacetil)-beta-Nal-D-Cpa-Pal-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; (H)(4-(2-hidroxietil)-1-piperizinaetanosulfonil)-beta-Nal-D-Cpa-Pal-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; H₂-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; (H)(CH₃CO)-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; (H)(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilacetil)-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; (H)(4-(2-hidroxietil)-1-piperizinaetanosulfonil)-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; H₂-beta-Nal-D-Cpa-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; (H)(CH₃CO)-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; (H)(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilacetil)-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; (H)(CH₃CO)-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; (H)(4-(2-hidroxietil)-1-piperizinaetanosulfonil)-beta-Nal-D-Cpa-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; H₂-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-beta-Nal-NH₂; (H)(CH₃CO)-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-beta-Nal-NH₂; (H)(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilacetil)-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-beta-Nal-NH₂; (H)(4-(2-hidroxietil)-1-piperizinaetanosulfonil)-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-beta-Nal-NH₂; H₂-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-beta-Nal-NH₂; o H₂-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; H₂-D-beta-Nal-D-Cpa-Phe-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; H₂-D-beta-Nal-D-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; H₂-D-Phe-D-Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; H₂-D-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-Thr-NH₂; o H₂-D-beta-Nal-D-Cpa-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe-beta-Nal-NH₂.

15 Los péptidos análogos de GHRH data de la década de 1990, e incluyen el "antagonista estándar" (Ac-Tyr', D-Arg2]hGH-RH (1-29) Nha. La Patente de EE.UU. n° 4.659.693 describe análogos antagonistas que contienen determinados residuos de N,N'-dialquil-omega-guanidino alfa-amino acilo en posición 2 de la secuencia GH-RH (1-29). Cabe destacar las siguientes publicaciones, WO91/16923 describe modificaciones de hGH-RH que incluyen: reemplazar Tyr1, Ala2, Asp3 o Asn8 por sus isómeros D; reemplazar Asn8 por L- o D-Ser, D-Arg, Asn, Thr, Gln o D-Lys; reemplazar Ser9 por Ala para potenciar la anfifilicidad de la región; y reemplazar Goy'S por Ala o Aib. La

20 patente US5.084.555 describe un análogo [Se-psi [CH₂-NH]-Tyr1°]hGH-RH (1-29) que incluye un enlace pseudo-peptídico (es decir, un enlace peptídico reducido a un enlace [CH₂-NH]) entre los residuos R9 y R10. Las patentes US 5.550.212, US5.942.489 y US6.057.422 describen análogos de hGH-RH (1-29) NH₂ producidos mediante reemplazamiento de varios aminoácidos y acilación con ácidos aromáticos o no polares en el extremo N de GH-RH

25 (1-29) NH₂. Se han demostrado las propiedades inhibitorias de tumor de los antagonistas presentados en la Patente de EE.UU. n° 5.942.489 y en la Patente de EE.UU. n° 6.057.422 usando ratones nude que portan xenoinjertos de modelos de cáncer humano experimentales. Los ejemplos específicos incluyen: [PhAc-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Amp9, Tyr (Me)10, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH (1-29) NH₂; [PhAc-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl)6, Amp9, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1-29)NH₂; [PhAc-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, His9, Tyr (Me)10, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO-Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl)6, Amp9, Tyr (Me)10, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1- 29) NH₂; [HOOC (CH₂) 8CO-Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl) 6, Amp9, Tyr (Me)10, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH (1-29) NH₂; [HOOC (CH₂) 2CO-Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl) 6, Amp9, Tyr (Me)10, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH (1-29) NH₂; [PhAc-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl)6, Amp9, Tyr (Me)10, His11, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1- 29) NH₂; [PhAc-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Cit8, Amp9, Tyr (Me)10, His", Abu'5, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1- 29) NH₂; [1-nac-Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl) 6, Cit8, Amp9, Tyr (Me)10, His11, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH- RH (1-29) NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Cit8, Amp9, Tyr (Me)10, His", Abu15, Nle27, D-Arg28 Har'] hGH-RH (1-29) NH₂; [HOOC (CH₂) 12CO-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Cit8, Amp9, Tyr (Me)10, His", Abu'5, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29)NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO -Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl)6, Cit8, Amp9, Tyr (Et)°, His", Abu'5, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Cit8, Amp9, Tyr (Et)10, His11, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1-29)NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO -Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl) 6, Alpe, His9, Tyr (Et)10, His11, Abu15, Nle27, D-Arg28, i Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [HOOC (CH₂) 8CO -Tyr1, D-Arg2, Phe(pCl)6, Ala8, His9, Tyr(Et)10, His11, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [HOOC(CH₂)12CO -Tyr1, D-Arg2, Phe(pCl)6, Ala8, His9, Tyr(Et)10, His11, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl)6, Ala8, His9, Tyr (Et)10, His11, Abu15, His20, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO-Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl)6, Ala8, Amp9, Tyr (Et)10, His11, Abu15, His20, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1-29)NH₂; [HOOC (CH₂)1 2CO-Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl) 6, Ala8, His9, Tyr (Et)10, His11, Abu15, His20, Nle27, D-Arg28, Har2]hGH-RH' (1-29) NH₂; [HOOC(CH₂)12CO-Tyr1, D-Arg2, Phe(pCl)6, Ala8, Amp9, Tyr(Et)10, His11, Abu15, His20, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1-29)NH₂; [1-Nac-Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl) 6, Ala8, His9, Tyr (Et)10, His11, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1-29) NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO -Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl) 6, His9, Tyr (Et)°, His", Abu'5, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH- RH (1-29) NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl)6, Ala8, His9, Cit15, Nle27, D-Arg28, har29]hGH-RH (1-29) NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO-Tyr1, D-Arg2, Phe(pCl)6, Ala8, His9, tyr(Et)10, His11, His15, His20, Nle27, D-Arg28 Har29]hGH-RH (1-29) NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Ala8, His9, Tyr (Et)10, His11, Orn12, Abu15, Orn21, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Alas, His9, Tyr (Et)10, His11, Orn12, Abu15, His20, Orn21, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl)6, Ala8, Amp9, Tyr(Et)10, His11, Orn12, Abu15, His20, Orn21 Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [CH₃(CH₂)6CO -Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl) 6, Ala8, His9, Dip10, His11, Orn12, Abu15, His20, Orn21, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1-29)NH₂; [CH₃ (CH₂) 6CO-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Ala8, His9, Phe (pNO₂)10, His11, Orn12, Abu15, His20, Orn21, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-

Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Har9, Tyr (Me)10, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29, Har30]hGH-RH (1-30) NH₂; [Hca-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Har9, Tyr (Me)10, Abu15, Nle27, D-Arg28, D-Arg29, Har30]hGH-RH(1- 30) NH₂; [Hca-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Har9, Tyr (Me)10, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29, D-Arg30]hGH-RH(1- 30) NH₂; [Hca-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Har9, Tyr (Me)10, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29, Agm30] hGH-RH (1-30); [PhAc-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Har9, Tyr (Me)10, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29, Agm30] hGH-RH (1-30); [PhAc-Tyr', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Har9, Tyr (Me)10, His11, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1-29)NH₂; [PhAc-Tyr1, D-Arg2, Phe(pCl)6, Har9, Tyr(Me)10, Har11, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1-29) NH₂ [PhAc-Tyr1, D-Arg2, Phe(pCl)6, Har9, Tyr (Me)10, Amp11, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [PhAc-Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl)6, Har9, Tyr (Me)10, Cit", Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1-29) NH₂; [PhAc-Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl)6, Har9, Tyr (Me)°°, Abu15, His20, Nle, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1-29) NH₂; [PhAc-Tyr', D-Arg2, Phe(pCl)6, Har9, Tyr (Me)10, His", Abu15, His20, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH- RH (1-29) NH₂; [PhAc-Tyr1, D-Arg2, Phe (pCl) 6, Arg9, Cit15, Nie27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1-29)NH₂; [PhAc°, D-Arg2, Phe (pCl)6, Arg9, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [IndAc0, D-Arg2, Phe(pCl)6, Arg9, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1- 29) NH₂; [PhAc°, D-Arg2, Phe (pCl) 6, Arg9, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [PhAc°, D-Arg2, Phe (pCl)6, Arg9, Tyr(Me)10, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [PhAc°, D-Arg2, Phe (pCl) 6, Arg9, Tyr (Me)10, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [PhAc°, His', D-Arg2, Phe (pCl) 6, Arg9, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [PhAc°, D-Arg2, Phe (pCl) 6 Arg9, Abu'5, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [IndAc°, D-Arg2, Phe (pCl)6, Arg9, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [PhAc°, D-Arg2, Phe (pCl) 6, Har9, Tyr (Me)10, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH (1-29) NH₂; [PhAc°, His', D- Arg2, Phe (pCl)6, Arg9, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH(1-29)NH₂; [Nac°, His', D-Arg2, Phe(pCl)6, Arg9, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1-29)NH₂; [Nac°, His', D-Arg2, Phe(pCl)6, Arg9, Abu15, Nle27, D-Arg28, Har29]hGH-RH(1-28)Agm; [Ibu°,D-Arg², Phe(pCl)^{8 10}, Abu¹⁵, Nle²⁷]hGH-RH(1-28)Agm; [PhAc°,D-Arg², Phe(pCl)6, Abu¹⁵, Nie⁷]hGH-RH(1-28)Agm; [PhAc°,D-Arg², Phe(pCl)6, Ala¹⁵, Nle²⁷]hGH-RH(1-29)-NH₂; [PhAc°, D-Arg²,Phe(pCl)6, Abu⁸,Ala⁸⁵,Nle²⁷]hGH-RH(1-29)NH₂; [PhAc°, D-Arg², Phe(pCl)6, Abu^{8,28}, Ala¹⁵, Nle²⁷]hGH-RH(1-29)-NH₂; ciclo^{8,12}[PhAc°,D-Arg²,Phe(pCl)6,Glu⁶,Ala¹⁵,Nle²⁷]hGH-RH(1-29)-NH₂; ciclo^{17,21}[PhAc°,D-Arg²,Phe(pCl)6,Ser⁸,Ala¹⁵,Glu¹⁷,Nle²⁷]hGH-RH(1-29)-NH₂; ciclo^{8,12;21;25}[PhAc°,D-Arg²,Phe(pCl)6,Glu^{8,25}, Abu¹⁵,Nle²⁷]hGH-RH(1-28)Agm; ciclo^{8,12;21;25}[PhAc°,D-Arg²,D-Asp³,Phe(pCl)6,Glu^{8,25},D-Lys¹²,Ala¹⁶,Nle²⁷]hGH-RH(1-29)-NH₂; ciclo^{8,12;21;25}[PhAc°,D-Arg², Phe(pCl)6, Glu^{8,25}, D-Lys¹², Ala¹⁵, Nle²⁷] hGH-RH(1-29)-NH₂. En los documentos de patente WO96/032126, WO96/022782, WO96/016707, WO94/011397 y WO94/011396 se proporcionan ejemplos adicionales de análogos de GHRH.

Los ejemplos de análogos de bombesina incluyen TMs que comprenden: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂ (nombre código BIM-26218), D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Leu-NH₂ (nombre código BIM-26187); D-Cpa-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-cp [CH₂NH]-Phe-NH₂ (nombre código BIM-26159), y D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-cp [CH₂NH]-Cpa-NH₂ (nombre código BIM-26189); D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-N-metil-D-Ala-His-Leu-metiléster, y D-Fg-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leu-metiléster.

Los análogos de bombesina incluyen péptidos derivados de péptidos naturales estructuralmente relacionados, a saber, bombesina, neuromedina B, neuromedina C, litorina y GRP. Las secuencias de aminoácido relevantes de dichos péptidos naturales son: Bombesina (últimos 10 aminoácidos): Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂; Neuromedina B: Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH₂; Neuromedina C: Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂; Litorina: pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met-NH₂; GRP humana (últimos 10 aminoácidos): Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂.

Los análogos incluyen los descritos en la patente de EE.UU. con número de serie 502.438, presentada el 30 de marzo de 1990, la patente de EE.UU. con número de serie 397.169, presentada el 21 de agosto de 1989, la patente de EE.UU. con número de serie 376.555, presentada el 7 de julio de 1989, la patente de EE.UU. con número de serie 394.727, presentada el 16 de agosto de 1989, la patente de EE.UU. con número de serie 317.941, presentada el 2 de marzo de 1989, la patente de EE.UU. con número de serie 282.328, presentada el 9 de diciembre de 1988, la patente de EE.UU. con número de serie 257.998, presentada el 14 de octubre de 1988, la patente de EE.UU. con número de serie 248.771, presentada el 23 de septiembre de 1988, la patente de EE.UU. con número de serie 207.759, presentada el 16 de junio de 1988, la patente de EE.UU. con número de serie 204.171, presentada el 8 de junio de 1988, la patente de EE.UU. con número de serie 173.311, presentada el 25 de marzo de 1988, la patente de EE.UU. con número de serie 100.571, presentada el 24 de septiembre de 1987; y la patente de EE.UU. con número de serie 520.225, presentada el 9 de mayo de 1990, la patente de EE.UU. con número de serie 440.039, presentada el 21 de noviembre de 1989. También se describen análogos de bombesina en Zachary et al., Proc. Nat. Aca. Sci. 82: 7616 (1985); Heimbrook et al., "Synthetic Peptides: Approaches to Biological Problems", UCLA Symposium on Mol. and Cell. Biol. New Series, Vol. 86, ed. Tarn y Kaiser; Heinz-Erian et al., Am. J. Physiol. G439 (1986); Martinez et al., J. Med. Chem. 28: 1874 (1985); Gargosky et al., Biochem. J. 247: 427 (1987); Dubreuil et al., Drug Design and Delivery, Vol 2: 49, Harwood Academic Publishers, GB (1987); Heikkila et al., J. Biol. Chem. 262: 16456 (1987); Caranikas et al., J. Med. Chem. 25: 1313 (1982); Saeed et al., Peptides 10: 597 (1989); Rosell et al., Trends in Pharmacological Sciences 3: 211 (1982); Lundberg et al., Proc. Nat. Aca. Sci. 80: 1120, (1983); Engberg et al., Nature 293: 222 (1984); Mizrahi et al., Euro. J. Pharma. 82: 101 (1982); Leander et al., Nature 294: 467 (1981); Woll et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 155: 359 (1988); Rivier et al., Biochem. 17: 1766 (1978); Cuttitta et al., Cancer Surveys 4: 707 (1985); Aumelas et al., Int. J. Peptide Res. 30: 596 (1987).

Los análogos se pueden preparar mediante técnicas convencionales, tales como las descritas en las patentes WO92/20363 y EP0737691.

Otros análogos de bombesina adicionales comprenden: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- ϵ -Tyr-Tac-NH₂; D-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- ϵ -Tyr-Tac-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- ϵ -Tyr-DMT-Tac-NH₂; Hca-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- ϵ -Tyr-Tac-NH₂; D-Trp-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-NH₂; D-Trp-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Phe-NH₂; D-Trp-Glu(MeNH)-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Phe-NH₂; D-Trp-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Trp-NH₂; D-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Leu-NH₂; D-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Phe-NH₂; D-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Trp-NH₂; D-pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Tpi-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Tpi-NH₂; D-Trp-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Tpi-NH₂; Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Tpi-NH₂; NH₂CO-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Tpi-NH₂ y ACY-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Tpi-NH₂ en donde ACY es acetilo, octanoilo o 3-hidroxi-2-naftoilo; D-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Tpi-NH₂; D-Trp-Glu(MeO)-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Tpi-NH₂; D-Trp-Glu(MeNH)-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Tpi-NH₂; D-Trp-His(Bz)-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Tpi-NH₂; Phe-Glu-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi-Tpi-NH₂; H₂-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Nal-Cys-Thr-NH₂; H₂-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Nal-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-D-Nal-NH₂; H₂-D-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-D-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Trp-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Phe-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Nal-Cys-Tyr-D-Nal-Lys-Val-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Nal-Cys-Thr-NH₂; H₂-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Val-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Ser-Cys-Thr-NH₂; H₂-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Nal-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Nal-NH₂; or H₂-D-Nal-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Dab-Val-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Val-Cys-Nal-NH₂; H₂-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Val-Cys-Nal-NH₂; pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Leu-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Leu-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂; D-Cpa-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂; D-Cpa-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leu-Leu-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leu-Met-NH₂; D-Cpa-Gln-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leu-Met-NH₂; pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Leu-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Leu-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Phe-Met-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Phe-Leu-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Nle-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leu-Nle-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Nle-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Phe-Nle-NH₂; D-p-Cl-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuc[CH₂NH]Phe-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-propilamida; Ac-His-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leu-Leu-NH₂; D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-CHx-Ala-Leu-NH₂; ciclo-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Leu; D-Cys-Asn-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Cys-NH₂; ciclo-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met; Cys-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Cys-NH₂; ciclo-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met; ciclo-D-Phe-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met; ciclo-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met.

Otros análogos adicionales de bombesina se describen, por ejemplo, en las patentes WO89/02897, WO91/17181, WO90/03980 y WO91/02746.

Los ejemplos de análogos de grelina comprenden: Tyr-DTrp-DLys-Trp-DPhe-NH₂, Tyr-DTrp-Lys-Trp-DPhe-NH₂, His-DTrp-DLys-Trp-DPhe-NH₂, His-DTrp-DLys-Phe-DTrp-NH₂, His-DTrp-DArg-Trp-DPhe-NH₂, His-DTrp-DLys-Trp-DPhe-Lys-NH₂, DesaminoTyr-DTrp-Ala-Trp-DPhe-NH₂, DesaminoTyr-DTrp-DLys-Trp-DPhe-NH₂, DeaminoTyr-DTrp-Ser-Trp-DPhe-Lys-NH₂, DesaminoTyr-DTrp-Ser-Trp-DPhe-NH₂, His-DTrp-DTrp-Phe-Met-NH₂, Tyr-DTrp-DTrp-Phe-Phe-NH₂, Gly ψ [CH₂NH]-D β Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂, Gly ψ [CH₂NH]-DbetaNal-DLys-Trp-DPhe-Lys-NH₂, DAla-DbetaNal-DLys-DTrp-Phe-Lys-NH₂, His-DbetaNal-DLys-Trp-DPhe-Lys-NH₂, Ala-His-DTrp-DLys-Trp-DPhe-Lys-NH₂, Alap[CH₂NH]-DbetaNal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂, DbetaNal-Ala-Trp-DPhe-Ala-NH₂, DAla-DciclohexilAla-Ala-Phe-DPhe-Nle-NH₂, DciclohexilAla-Ala-Phe-DTrp-Lys-NH₂, DAla-DbetaAla-Thr-DThr-Lys-NH₂, DciclohexilAla-Ala-Trp-DPhe-NH₂, DAla-DbetaNal-Ala-Ala-DAla-Lys-NH₂, DbetaNal-Ala-Trp-DPhe-Leu-NH₂, His-DTrp-Phe-Trp-DPhe-Lys-NH₂, DAla-DbetaNal-DAla-DTrp-Phe-Lys-NH₂, pAla-Trp-DAla-DTrp-Phe-NH₂, His-Trp-DAla-DTrp-Phe-Lys-NH₂, DLys-D β Nal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂, DAla-DbetaNal-DLys-DTrp-Phe-Lys-NH₂, Tyr-DAla-Phe-Aib-NH₂, Tyr-DAla-Sar-NMePhe-NH₂, α Abu-DTrp-DTrp-Ser-NH₂, α Abu-DTrp-DTrp-Lys-NH₂, α Abu-DTrp-DTrp-Orn-NH₂, α Abu-DTrp-DTrp-Orn-NH₂, DThr-D α Nal-DTrp-DPro-Arg-NH₂, DAla-Ala-DAla-DTrp-Phe-Lys-NH₂, Ala ψ [CH₂NH]His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂, Lys-DHis-DTrp-Phe-NH₂, γ Abu-DTrp-DTrp-Orn-NH₂, inip-Trp-Trp-Phe-NH₂, Ac-DTrp-Phe-DTrp-Leu-NH₂, Ac-DTrp-Phe-DTrp-Lys-NH₂, Ac-DTrp-DTrp-Lys-NH₂, DLys-Tyr-DTrp-DTrp-Phe-Lys-NH₂, Ac-DbetaNal-Leu-Pro-NH₂, pAla-Trp-DTrp-DTrp-Orn-NH₂, DVal-Da α Nal-DTrp-Phe-Arg-NH₂, DLeu-Da α Nal-DTrp-Phe-Arg-NH₂, DciclohexilAla-Da α Nal-DTrp-Phe-Arg-NH₂, DTrp-Da α Nal-DTrp-Phe-Arg-NH₂, DAla-D β Nal-DPro-Phe-Arg-NH₂, Ac-Da α Nal-DTrp-Phe-Arg-NH₂, D α Nal-DTrp-Phe-Arg-NH₂, His-DTrp-DTrp-Lys-NH₂, Ac-DpNal-DTrp-NH₂, α Aib-DTrp-DciclohexilAla-NH₂, α Aib-DTrp-DAla-ciclohexilAla-NH₂, DAla-DciclohexilAla-Ala-Ala-Phe-DPhe-Nle-NH₂, DPhe-Ala-Phe-DPal-NH₂, DPhe-Ala-Phe-DPhe-Lys-NH₂, DLys-Tyr-DTrp-DTrp-Phe-NH₂, Ac-DLys-Tyr-DTrp-DTrp-Phe-NH₂, Arg-DTrp-Leu-Tyr-Trp-Pro(cyclic Arg-Pro), Ac-D β Nal-PicLys-ILys-DPhe-NH₂, DPAl-Phe-DTrp-Phe-Met-NH₂, DPhe-Trp-DPhe-Phe-Met-NH₂, DPAl-Trp-DPhe-Phe-Met-NH₂, pAla-Pal-DTrp-DTrp-Orn-NH₂, α Abu-Trp-DTrp-DTrp-Orn-NH₂, β Ala-Trp-DTrp-DTrp-Lys-NH₂, γ Abu-Trp-DTrp-DTrp-Orn-NH₂, Ava-Trp-DTrp-DTrp-Orn-NH₂, DLys-Tyr-DTrp-Ala-Trp-DPhe-NH₂, His-DTrp-DArg-Trp-DPhe-NH₂, <Glu-His-Trp-DSer-DArg-NH₂, DPhe-DPhe-DTrp-Met-DLys-NH₂, 0-(2-metilalil) benzofonona oxima, (R)-2-amino-3-(1H-indol-3-il)-1-(4-fenilpiperidin-1-il)propan-1-ona, N-((R)-1-((R)-1-((S)-3-(1H-indol-3-il)-1-oxo-1-(4-fenilpiperidin-1-il)propan-2-ilamino)-6-amino-1-oxohexan-2-ilamino)-3-hidroxi-1-oxopropan-2-il)benzamida, (S)-N-((S)-3-(1 H-indol-3-il)-1-oxo-1-(4-fenilpiperidin-1-il)propan-2-il)-6-acetamido-2-((S)-

2-amino-3-(benziloxi)propanamido)hexanamida, (S)-N-((R)-3-(1H-indol-3-il)-1-oxo-1-(4-fenilpiperidin-1-il)propan-2-il)-2-((S)-2-acetamido-3-(benziloxi)propanamido)-6-aminohexanamida, (R)-N-(3-(1H-indol-3-il)-1-(4-(2-metoxifenil)piperidin-1-il)-1-oxopropan-2-il)-4-aminobutanamida, (R)-N-(3-(1H-indol-3-il)-1-(4-(2-metoxifenil)piperidin-1-il)-1-oxopropan-2-il)-2-amino-2-metilpropanamida, metil 3-(p-tolilcarbamoil)-2-naftoato, etil 3-(4-(2-metoxifenil)piperidina-1-carbonil)-2-naftoato, 3-(2-metoxifenilcarbamoil)-2-naftoato, (S)-2,4-diamino-N-((R)-3-(naftalen-2-ilmetoxi)-1-oxo-1-(4-fenilpiperidin-1-il)propan-2-il)butanamida, naftaleno-2,3-diilbis((4-(2-metoxifenil)piperazin-1-il)metanona), (R)-2-amino-N-(3-(benziloxi)-1-oxo-1-(4-fenilpiperazin-1-il)propan-2-il)-2-metilpropanamida, o (R)-2-amino-3-(benziloxi)-1-(4-fenilpiperazin-1-il)propan-1-ona.

Los ejemplos de análogos de GnRH incluyen los conocidos de, por ejemplo, las patentes EP171477, WO96/033729, WO92/022322, WO92/013883 y WO91/05563. Ejemplos específicos comprenden:

- (NAcDQal¹, DPTf², DPAI³, cjsPzACAla⁵, DPicLys⁶, DAla¹⁰)LHRH;
- NAcDNal¹, DpCIPhe², DPal³, cjsPzACAla⁵, DNicLys⁶, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH;
- (NAcDNal¹, DpCIPhe², DPal³, Thr⁴, PicLys⁵, DPicLys⁶, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH;
- (NAcDNal¹, DpCIPhe², DPal³, PicLys⁵, DPicLys⁶, Thr⁷, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH;
- 15 (NapDThr¹, DpCIPhe², DPal³, PicLys⁵, DPicLys⁶, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH;
- (NAcDNal¹, DpCIPhe², DPal³, NicLys⁵, DNicLys⁶, Thr⁷, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH;
- (NAcDNal¹, DpCIPhe², DPal³, Thr⁴NicLys⁵, DNicLys⁶, Thr⁷, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH;
- (NAcDNal¹, DpCIPhe², DPal³, PicLys⁵, D(PicSar)Lys⁶, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH'
- (NAcDNal¹, DpCIPhe², DPal³, D(PicSar)Lys⁶, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH;
- 20 (NAcDNal¹, DpCIPhe², DPal³, PicLys⁵, D(6ANic)Lys⁶, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH;
- (NAcDNal¹, DpCIPhe², DPal³, PicLys⁵, D(6ANic)0rn⁶, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH;
- (NAcDQal¹, DCpa², DPal³, cisPzACAla⁵, DPicLys⁶, NLeu⁷, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH;
- (NAcDNal¹, DCpa², DPal³, DPicLys⁵, DAPhe(PicSar)⁶, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH;
- NAcDQal¹, DCpa², DPal³, PicLys⁵, DPal⁶, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH;
- 25 (NAcDNal¹, DCpa², DPal³, PicLys⁵, DOrn(ACyp)⁶, ILys⁸, DAla¹⁰)LHRH; N-acetil-D-beta-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Lys(ciclo-pentil)-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂; N-acetil-D-ø-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Lys(ciclopentil)-Phe-Lys(ciclopentil)-Pro-D-Ala-NH₂; N-acetil-D-beta-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Arg-Phe-(isopropil)D-Lys-Pro-D-Ala-NH₂; N-acetyl-D-beta-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Lys(bencil)-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂; N-acetil-D-beta-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Lys(Ci-bencil)-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂; N-acetil-D-beta-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Lys(heptil)-Phe-Arg-Pro-D-Ala-NH₂; N-acetil-D-beta-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Arg-Phe-Lys-(t-butilmetil)-Pro-D-Ala-NH₂; N-acetil-D-beta-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Arg-Phe-Lys-(4-metil-bencil)-Pro-D-Ala-NH₂; N-acetil-D-beta-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Arg-Phe-Lys-(bencil)-Pro-D-Ala-NH₂; N-acetil-D-beta-Nal-D-p-Ci-Phe-D-Trp-Ser-Tyr-D-p-NH₂-Phe-Phe-(isopropil)Lys-Pro-D-Ala-NH₂; N-acetil-D-beta-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Lys(heptil)-Phe-Lys-(heptil)-Pro-D-Ala-NH₂; N-acetil-D-3-Nal-D-Phe-D-Phe-Ser-Tyr-D-Lys(1-butilpentil)-Phe-Lys(1-butilpentil)-Arg-Pro-D-Ala-NH₂.
- 30
- 35 Los ejemplos de análogos de urotensina comprenden: Cpa-c [D-Cys-Phe-Trp-Lys-Thr-Cys]-Val-NH₂; y Asp-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH.

Los polipéptidos de la presente invención carecen de un dominio H_C funcional de una neurotoxina clostridial. Por consiguiente, dichos polipéptidos no son capaces de unirse a membranas sinaptosomales (a través de un componente H_C clostridial) en ensayos de unión, como se describe en Shone et al. (1985) Eur. J. Biochem. 151, 75-82. En una realización preferida, los polipéptidos preferiblemente carecen de los últimos 50 aminoácidos C-terminales de una holotoxina neurotoxina clostridial. En otra realización, los polipéptidos preferiblemente carecen de los últimos 100, preferiblemente de los últimos 150, más preferiblemente de los últimos 200, de forma particularmente preferida de los últimos 250, y lo más preferiblemente de los últimos 300 residuos de aminoácido C-terminales de una holotoxina neurotoxina clostridial. Alternativamente, la actividad de unión a H_C se puede negar/reducir mediante mutagénesis – a modo de ejemplo, en referencia a BoNT/A por convención, la modificación de una o dos mutaciones de residuos de aminoácido (W1266 a L e Y1267 a F) en el bolsillo de unión de gangliósido hace que la región H_C pierda su función de unión a receptor. Se pueden realizar mutaciones análogas a componentes peptídicos clostridiales no de serotipo A, p.ej., una construcción basada en botulínica B con mutaciones (W1262 a L e Y1263 a F) o botulínica E (W1224 a L e Y1225 a F). Otras mutaciones en el sitio activo logran la misma ablación de la actividad de unión a receptor de H_C, p.ej., Y1267S en la toxina botulínica de tipo A y

el correspondiente residuo altamente conservado en las otras neurotoxinas clostridiales. Los detalles de ésta y otras mutaciones se describen en Rummel et al (2004) (Molecular Microbiol. 51: 631-634).

En otra realización, los polipéptidos de la presente invención carecen de un dominio H_C funcional de una neurotoxina clostridial y también carecen de cualquier TM funcionalmente equivalente. Por consiguiente, dichos polipéptidos carecen de la función de unión natural de una neurotoxina clostridial y no son capaces de unirse a membranas sinaptosomales de rata (a través de un componente H_C clostridial, o a través de cualquier TM funcionalmente equivalente) en ensayos de unión como se describe en Shone et al. (1985) Eur. J. Biochem. 151, 75-82.

El péptido H_C de una neurotoxina clostridial nativa comprende aproximadamente 400-440 residuos de aminoácido, y consta de dos dominios funcionalmente distintos de aproximadamente 25 kDa cada uno, a saber, la región N-terminal (comúnmente denominada péptido o dominio H_{CN}) y la región C-terminal (comúnmente denominada péptido o dominio H_{CC}). Este hecho es confirmado en las siguientes publicaciones: Umland TC (1997) Nat. Struct. Biol. 4: 788-792; Herreros J (2000) Biochem. J. 347: 199-204; Halpern J (1993) J. Biol. Chem. 268: 15, pág. 11188-11192; Rummel A (2007) PNAS 104: 359-364; Lacey DB (1998) Nat. Struct. Biol. 5: 898-902; Knapp (1998) Am. Cryst. Assoc. Abstract Papers 25: 90; Swaminathan and Eswaramoorthy (2000) Nat. Struct. Biol. 7: 1751-1759; y Rummel A (2004) Mol. Microbiol. 51(3), 631-643. Además, ha sido bien documentado que la región C-terminal (H_{CC}), que constituye los 160-200 residuos de aminoácido C-terminales, es responsable de la unión de una neurotoxina clostridial a sus receptores celulares naturales, a saber, las terminales nerviosas de la unión neuromuscular – este hecho también es confirmado en las publicaciones anteriores. De esta manera, cuando se hace referencia a lo largo de la presente especificación a una cadena-pesada clostridial que carece de un péptido (o dominio) HC de cadena pesada funcional, de tal modo que la cadena pesada es incapaz de unirse a los receptores de superficie celular a los que una neurotoxina clostridial nativa se une, significa que la cadena pesada clostridial simplemente carece de un péptido H_{CC} funcional. En otras palabras, la región de péptido H_{CC} ha sido eliminada parcial o totalmente, o ha sido modificada (mediante tratamiento químico o proteolítico convencional) para desactivar su capacidad nativa de unión a terminales nerviosas en la unión neuromuscular.

De esta manera, en una realización, un péptido H_N clostridial de la presente invención carece de una porción de péptido C-terminal (H_{CC}) de una neurotoxina clostridial y por tanto carece de la función de unión a H_C de la neurotoxina clostridial nativa. A modo de ejemplo, en una realización, el péptido H_N clostridial extendido C-terminalmente carece de los 40 residuos de aminoácido C-terminales, o de los 60 residuos de aminoácido C-terminales, o de los 80 residuos de aminoácido C-terminales, o de los 100 residuos de aminoácido C-terminales, o de los 120 residuos de aminoácido C-terminales, o de los 140 residuos de aminoácido C-terminales, o de los 150 residuos de aminoácido C-terminales, o de los 160 residuos de aminoácido C-terminales de una cadena pesada de neurotoxina clostridial. En otra realización, el péptido H_N clostridial de la presente invención carece de la porción completa de péptido C-terminal (H_{CC}) de una neurotoxina clostridial y por tanto carece de la función de unión a H_C de la neurotoxina clostridial nativa. A modo de ejemplo, en una realización, el péptido H_N clostridial carece de los 165 residuos de aminoácido C-terminales, o de los 170 residuos de aminoácido C-terminales, o de los 175 residuos de aminoácido C-terminales, o de los 180 residuos de aminoácido C-terminales, o de los 185 residuos de aminoácido C-terminales, o de los 190 residuos de aminoácido C-terminales, o de los 195 residuos de aminoácido C-terminales de una cadena pesada de neurotoxina clostridial. A modo de ejemplo adicional, el péptido H_N clostridial de la presente invención carece de una secuencia de referencia H_{CC} seleccionada del grupo que consiste en:

Neurotoxina botulínica de tipo A – residuos de aminoácido (Y1111-L1296)

Neurotoxina botulínica de tipo B – residuos de aminoácido (Y1098-E1291)

Neurotoxina botulínica de tipo C – residuos de aminoácido (Y1112-E1291)

Neurotoxina botulínica de tipo D – residuos de aminoácido (Y1099-E1276)

Neurotoxina botulínica de tipo E – residuos de aminoácido (Y1086-K1252)

Neurotoxina botulínica de tipo F – residuos de aminoácido (Y1106-E1274)

Neurotoxina botulínica de tipo G – residuos de aminoácido (Y1106-E1297)

Neurotoxina del tétanos – residuos de aminoácido (Y1128-D1315).

Las secuencias de referencia identificadas antes deberían considerarse una guía, ya que se pueden producir pequeñas variaciones según los sub-serotipos.

La proteasa de la presente invención es capaz de romper una o más proteínas del aparato de fusión exocítica en células eucarióticas.

La proteasa de la presente invención es tal y como se define en las reivindicaciones. De forma más preferible, la proteasa bacteriana se selecciona del género *Clostridium* o *Neisserial Streptococcus* (p.ej., una cadena-L clostridial, o una proteasa de IgA neisserial, preferiblemente de *N. gonorrhoeae* o *S. pneumoniae*).

La presente invención también abarca proteasas no citotóxicas variantes (es decir, variantes de moléculas de proteasa naturales), siempre que las proteasas variantes sigan presentando la actividad de proteasa requerida. A modo de ejemplo, una variante puede presentar al menos un 70%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90%, y lo más preferiblemente al menos un 95% o al menos un 98% de homología de secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de proteasa de referencia. Por tanto, el término variante incluye proteasas no citóticas que presentan una actividad de endopeptidasa incrementada (o reducida) – se hace particular mención aquí al aumento de K_{cat}/K_m de los mutantes de BoNT/A Q161A, E54A y K165L, véase Ahmed, S.A. (2008) Protein J. DOI 10.1007/s10930-007-9118-8. El término fragmento, cuando se usa en relación a una proteasa, típicamente significa un péptido que tiene al menos 150, preferiblemente al menos 200, más preferiblemente al menos 250, y lo más preferiblemente al menos 300 residuos de aminoácido de la proteasa de referencia. Como con el componente de “fragmento” TM (discutido anteriormente), los “fragmentos” de proteasa de la presente invención abarcan fragmentos de proteasas variantes basadas en una secuencia de referencia.

La proteasa de la presente invención preferiblemente presenta una actividad de serina o metaloproteasa (p.ej., actividad de endopeptidasa). La proteasa preferiblemente es específica para una proteína SNARE (p.ej., SNAP-25, sinaptobrevina/VAMP, o syntaxina).

Se hace mención particular a los dominios de proteasa de las neurotoxinas, por ejemplo los dominios de proteasa de neurotoxinas bacterianas. De esta manera, la presente invención abarca el uso de dominios de neurotoxina, que existen en la naturaleza, así como de versiones preparadas recombinantemente de dichas neurotoxinas naturales.

Los ejemplos de neurotoxinas son producidas por bacterias clostridia, y el término neurotoxina clostridial abarca neurotoxinas producidas por *C. tetani* (TeNT), y por *C. botulinum* (BoNT) serotipos A-G, así como por las neurotoxinas de tipo BoNT estrechamente relacionadas producidas por *C. baratii* y *C. butyricum*. Las abreviaturas mencionadas anteriormente se usan a lo largo de la presente especificación. Por ejemplo, la nomenclatura BoNT/A denota la fuente de neurotoxina como BoNT (serotipo A). A otros serotipos de BoNT se aplica la correspondiente nomenclatura.

Las BoNTs son las toxinas más potentes conocidas, con unos valores de dosis letal de mediana (LD50) para ratones que oscilan entre 0,5 y 5 ng/kg, dependiendo del serotipo. Las BoNTs son adsorbidas en el tracto gastrointestinal, y, después de entrar en la circulación general, se unen a la membrana presináptica de las terminaciones nerviosas colinérgicas y evitan la liberación de su neurotransmisor acetilcolina. BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F y BoNT/G rompen la proteína de membrana asociada a vesícula (VAMP)/sinaptobrevina; BoNT/C, BoNT/A y BoNT/E rompen la proteína asociada sinaptosomática de 25 kDa (SNAP-25); y BoNT/C rompe la syntaxina.

Las BoNTs comparten una estructura común, siendo proteínas di-cadena de ~150 kDa, que constan de una cadena pesada (cadena-H) de ~100 kDa unida covalentemente mediante un único enlace disulfuro a una cadena ligera (cadena-L) de ~50 kDa. La cadena-H consta de dos dominios, cada uno de ~50 kDa. El dominio C-terminal (H_C) es requerido para la unión neuronal de alta afinidad, mientras que se propone que el dominio N-terminal (H_N) está implicado en la traslocalización de membrana. La cadena-L es una metaloproteasa dependiente de cinc responsable de la ruptura de la proteína SNARE sustrato.

El término fragmento de cadena-L significa un componente de la cadena-L de una neurotoxina, fragmento que presenta actividad de metaloproteasa y que es capaz de romper proteolíticamente una proteína de vesícula y/o asociada a membrana plasmática implicada en la exocitosis celular.

Los ejemplos de secuencias de proteasa adecuadas (de referencia) incluyen:

Neurotoxina botulínica de tipo A – residuos de aminoácido (1-448)

Neurotoxina botulínica de tipo B – residuos de aminoácido (1-440)

Neurotoxina botulínica de tipo C – residuos de aminoácido (1-441)

Neurotoxina botulínica de tipo D – residuos de aminoácido (1-445)

Neurotoxina botulínica de tipo E – residuos de aminoácido (1-422)

Neurotoxina botulínica de tipo F – residuos de aminoácido (1-439)

Neurotoxina botulínica de tipo G – residuos de aminoácido (1-441)

Neurotoxina del tétanos – residuos de aminoácido (1-457)

Proteasa de IgA – residuos de aminoácido (1-959)*

* Pohlner, J. et al. (1987). Nature 325, pág. 458-462.

Las secuencias de referencia identificadas anteriormente deberían considerarse una guía, ya que se pueden dar pequeñas variaciones según los sub-serotipos. A modo de ejemplo, la patente US 2007/0166332 cita secuencias clostridiales ligeramente diferentes.

Neurotoxina botulínica de tipo A – residuos de aminoácido (M1-K448)

5 Neurotoxina botulínica de tipo B – residuos de aminoácido (M1-K441)

Neurotoxina botulínica de tipo C – residuos de aminoácido (M1-K449)

Neurotoxina botulínica de tipo D – residuos de aminoácido (M1-R445)

Neurotoxina botulínica de tipo E – residuos de aminoácido (M1-R422)

Neurotoxina botulínica de tipo F – residuos de aminoácido (M1-K439)

10 Neurotoxina botulínica de tipo G – residuos de aminoácido (M1-K446)

Neurotoxina del tétanos – residuos de aminoácido (M1-A457)

Una variedad de fragmentos de toxina clostridial que comprende la cadena ligera pueden ser útiles en aspectos de la presente invención, con la condición de que dichos fragmentos de cadena ligera puedan atacar específicamente los componentes de núcleo del aparato de liberación de neurotransmisores y, de esta manera, participen en la ejecución del mecanismo celular general mediante el cual una toxina clostridial rompe proteolíticamente un sustrato. Las cadenas ligeras de las toxinas clostridiales tienen una longitud de aproximadamente 420-460 aminoácidos y comprenden un dominio enzimático. Investigaciones han demostrado que no es necesaria la longitud completa de una cadena ligera de toxina clostridial para la actividad enzimática del dominio enzimático. Como ejemplo no limitativo, los primeros ocho aminoácidos de la cadena ligera de BoNT/A no son requeridos para la actividad catalítica. Como ejemplo no limitativo adicional, los primeros ocho aminoácidos de la cadena ligera TeNT no son requeridos para la actividad enzimática. Igualmente, el extremo carboxilo de la cadena ligera no es necesario para la actividad. Como ejemplo no limitativo, los últimos 32 aminoácidos de la cadena ligera de BoNT/A (residuos 417-448) no son requeridos para la actividad enzimática. Como ejemplo no limitativo adicional, los últimos 31 aminoácidos de la cadena ligera de TeNT (residuos 427-457) no son requeridos para la actividad enzimática. De esta manera, los aspectos de esta realización pueden incluir cadenas ligeras de toxina clostridial que comprenden un dominio enzimático que tiene una longitud de, por ejemplo, al menos 350 aminoácidos, al menos 375 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos, al menos 425 aminoácidos y al menos 450 aminoácidos. Otros aspectos de esta realización pueden incluir cadenas ligeras de toxina clostridial que comprenden un dominio enzimático que tiene una longitud de, por ejemplo, como mucho 350 aminoácidos, como mucho 375 aminoácidos, como mucho 400 aminoácidos, como mucho 425 aminoácidos y como mucho 450 aminoácidos.

El componente de proteasa no citotóxico de la presente invención comprende preferiblemente una cadena-L de serotipo BoNT/A, BoNT/B o BoNT/D (o un fragmento o variante de la misma).

Los polipéptidos de la presente invención, especialmente su componente de proteasa, puede estar PEGilado – esto puede ayudar a incrementar la estabilidad, por ejemplo la duración de la acción del componente de proteasa. La PEGilación es particularmente preferida cuando la proteasa comprende una proteasa BoNT/A, B o C₁. La PEGilación preferiblemente incluye la adición de PEG al extremo N del componente de proteasa. A modo de ejemplo, el extremo N puede extenderse con uno o más residuos de aminoácido (p.ej., cisteína), que pueden ser iguales o diferentes. Uno o más de dichos residuos de aminoácido pueden tener su propia molécula de PEG unida (p.ej., unida covalentemente). En la patente WO2007/104567 se describe un ejemplo de esta tecnología.

40 Un Dominio de Traslocalización es una molécula que permite la traslocalización de una proteasa en una célula diana de tal modo que se produzca una expresión funcional de la actividad de proteasa dentro del citosol de la célula diana. El hecho de que una molécula dada (p.ej., una proteína o péptido) posea la función de traslocalización requerida de la presente invención puede confirmarse mediante uno cualquiera de una serie de ensayos convencionales. Por ejemplo, Shone C. (1987) describe un ensayo *in vitro* que emplea liposomas, que son expuestos a una molécula de ensayo. La presencia de la función de traslocalización requerida es confirmada por la liberación desde los liposomas de K⁺ y/ o de NAD marcado, que pueden ser monitorizados fácilmente [véase Shone C. (1987) Eur. J. Biochem; vol. 167(1): pág. 175-180].

Un ejemplo adicional es el proporcionado por Blaustein R. (1987), que describe un ensayo *in vitro* sencillo que emplea membranas bicapa de fosfolípidos planos. Las membranas son expuestas a una molécula de ensayo y la función de traslocalización requerida es confirmada por un incremento de la conductancia a través de dichas membranas [véase Blaustein (1987) FEBS Letts; vol. 226, no. 1: pág. 115-120].

Otras metodologías adicionales que permiten la determinación de la fusión de membrana, y por tanto la identificación de Dominios de Traslocalización adecuados para su uso en la presente invención, son las

proporcionadas en "Methods in Enzymology" vol. 220 y 221, "Membrane Fusion Techniques", Partes A y B, Academic Press 1993.

La presente invención también abarca dominios de traslocalización variantes, siempre que los dominios variantes sigan presentando la actividad de traslocalización requerida. A modo de ejemplo, una variante puede tener una homología de secuencia de aminoácidos de al menos un 70%, preferiblemente de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, y lo más preferiblemente de al menos un 95% o al menos un 98% con respecto a un dominio de traslocalización de referencia. El término fragmento, cuando se emplea en relación a un dominio de traslocalización, significa un péptido que tiene al menos 20, preferiblemente al menos 40, más preferiblemente al menos 80, y lo más preferiblemente al menos 100 residuos de aminoácido del dominio de traslocalización de referencia. En el caso de un dominio de traslocalización clostridial, el fragmento preferiblemente presente la menos 100, preferiblemente al menos 150, más preferiblemente al menos 200, y lo más preferiblemente al menos 250 residuos de aminoácido del dominio de traslocalización de referencia (p.ej., dominio H_N). Como con el componente de "fragmento" de TM (discutido anteriormente), los "fragmentos" de traslocalización de la presente invención abarcan fragmentos de dominios de traslocalización variantes basados en secuencias de referencia.

El Dominio de Traslocalización preferiblemente es capaz de formar poros permeables a iones en membranas lipídicas en condiciones de bajo pH. Se ha observado que es preferible usar solo las porciones de la molécula de proteína capaces de formar poros en la membrana endosomal.

El Dominio de Traslocalización puede obtenerse a partir de una fuente de proteínas microbiana, en particular de una fuente de proteínas bacteriana o vírica. Por lo tanto, en una realización, el Dominio de Traslocalización es un dominio traslocalizador de una enzima, tal como una toxina bacteriana o una proteína vírica.

Está bien documentado que determinados dominios de moléculas de toxinas bacterianas son capaces de formar poros de ese tipo. También es sabido que determinados dominios de traslocalización de proteínas de fusión de membrana expresadas víricamente son capaces de formar poros de ese tipo. Dichos dominios pueden emplearse en la presente invención.

El Dominio de Traslocalización puede ser de origen clostridial, tal como el dominio H_N (o un componente funcional del mismo). H_N significa una porción o fragmento de la cadena-H de una neurotoxina clostridial aproximadamente equivalente a la mitad amino-terminal de la cadena-H, o el dominio correspondiente a dicho fragmento en la cadena-H intacta. La cadena-H carece de la función de unión natural del componente H_C de la cadena-H. En este aspecto, la función H_C puede eliminarse mediante la eliminación de la secuencia de aminoácidos H_C (tanto a nivel de síntesis de ADN, como a nivel post-síntesis mediante tratamiento con nucleasa o proteasa). Alternativamente, la función H_C puede desactivarse mediante tratamiento químico o biológico. De esta manera, la cadena-H es incapaz de unirse al Sitio de Unión de una célula diana al cual se une una neurotoxina clostridial nativa (es decir, una holotoxina).

Los ejemplos de Dominios de Traslocalización adecuados (de referencia) incluyen:

- Neurotoxina botulínica de tipo A – residuos de aminoácido (449-871)
- Neurotoxina botulínica de tipo B – residuos de aminoácido (441-858)
- Neurotoxina botulínica de tipo C – residuos de aminoácido (442-866)
- Neurotoxina botulínica de tipo D – residuos de aminoácido (446-862)
- Neurotoxina botulínica de tipo E – residuos de aminoácido (423-845)
- Neurotoxina botulínica de tipo F – residuos de aminoácido (440-864)
- Neurotoxina botulínica de tipo G – residuos de aminoácido (442-863)
- Neurotoxina del tétanos – residuos de aminoácido (458-879)

Las secuencias de referencia identificadas anteriormente deberían considerarse una guía, ya que se pueden dar pequeñas variaciones según los sub-serotipos. A modo de ejemplo, la patente US 2007/0166332 cita secuencias clostridiales ligeramente diferentes.

- Neurotoxina botulínica de tipo A – residuos de aminoácido (A449-K871)
- Neurotoxina botulínica de tipo B – residuos de aminoácido (A442-S858)
- Neurotoxina botulínica de tipo C – residuos de aminoácido (T450-N866)
- Neurotoxina botulínica de tipo D – residuos de aminoácido (D446-N862)
- Neurotoxina botulínica de tipo E – residuos de aminoácido (K423-K845)

Neurotoxina botulínica de tipo F – residuos de aminoácido (A440-K864)

Neurotoxina botulínica de tipo G – residuos de aminoácido (S447-S863)

Neurotoxina del tétanos – residuos de aminoácido (S458-V879)

5 En el contexto de la presente invención, pueden ser útiles una serie de regiones HN de toxina clostridial que comprenden un dominio de traslocalización en aspectos de la presente invención, siempre que dichos fragmentos activos puedan facilitar la liberación de una proteasa no citotóxica (p.ej., una cadena-L clostridial) a partir de vesículas intracelulares en el citoplasma de la célula diana y de esta manera participan en la ejecución del mecanismo celular general mediante el cual una toxina clostridial rompe proteolíticamente un sustrato. Las regiones HN de las cadenas pesadas de toxinas clostridiales tienen una longitud de aproximadamente 410-430 aminoácidos y
10 comprenden un dominio de traslocalización. Las investigaciones han demostrado que no es necesaria la longitud completa de una región HN de una cadena pesada de toxina clostridial para la actividad de traslocalización del dominio de traslocalización. Por tanto, los aspectos de esta realización pueden incluir regiones HN de toxina clostridial que comprenden un dominio de traslocalización que tiene una longitud, por ejemplo, de al menos 350 aminoácidos, al menos 350 aminoácidos, al menos 375 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos y al menos 425 aminoácidos. Otros aspectos de esta realización pueden incluir regiones HN de toxina clostridial que comprenden un dominio de traslocalización que tiene una longitud, por ejemplo, de como mucho 350 aminoácidos, como mucho 375 aminoácidos, como mucho 400 aminoácidos y como mucho 425 aminoácidos.

Para más detalles a nivel genético de la producción de toxinas en *Clostridium botulinum* y *C. tetani*, hacemos referencia a Henderson et al (1997) en "The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis", Academic press.

20 El término HN abarca porciones HN de neurotoxina naturales, y porciones HN modificadas que presentan secuencias de aminoácidos que no se dan en la naturaleza y/o residuos de aminoácidos sintéticos, siempre que las porciones HN modificadas sigan presentando la función de traslocalización mencionada anteriormente.

Alternativamente, el Dominio de Traslocalización puede tener un origen no clostridial. Los ejemplos de orígenes de Dominio de Traslocalización no clostridial (de referencia) incluyen, aunque sin limitación, el dominio de traslocalización de la toxina de la difteria [O'Keefe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89, 6202-6206; Silverman et al., J. Biol. Chem. (1993) 269, 22524-22532; y London, E. (1992) Biochem. Biophys. Acta., 1112, pág. 25-51], el dominio de traslocalización de la exotoxina de *Pseudomonas* de tipo A [Prior et al. Biochemistry (1992) 31, 3555-3559], los dominios de traslocalización de la toxina del ántrax [Blanke et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 8437-8442], una variedad de péptidos fusogénicos o hidrofóbicos de función traslocalizante [Plank et al. J. Biol. Chem. (1994) 269, 12918-12924; y Wagner et al (1992) PNAS, 89, pág. 7934-7938], y péptidos anfífilicos [Murata et al (1992) Biochem., 31, pág.1986-1992]. El Dominio de Traslocalización puede ser una imagen especular del Dominio de Traslocalización presente en una proteína natural, o puede incluir variaciones de aminoácidos, siempre que las variaciones no destruyan la capacidad de traslocalización del Dominio de Traslocalización.

35 Los ejemplos particulares de Dominios de Traslocalización víricos (de referencia) adecuados para su uso en la presente invención incluyen determinados dominios de traslocalización de proteínas de fusión de membrana expresadas víricamente. Por ejemplo, Wagner et al. (1992) y Murata et al. (1992) describen la función de traslocalización (es decir la fusión de membrana y la vesiculación) de una serie de péptidos fusogénicos y anfífilicos de la región N-terminal de la hemaglutinina del virus de la gripe. Otras proteínas de fusión de membrana expresadas víricamente que se sabe que poseen la actividad traslocalizadora deseada son un dominio traslocalizador de un péptido fusogénico del virus del bosque Semliki (SFV), un dominio traslocalizador de la glicoproteína G del virus de estomatitis vesicular (VSV), un dominio traslocalizador de la proteína F del virus SER y un dominio traslocalizador de la glicoproteína de envoltura del virus Foamy. Las proteínas Aspíke codificadas víricamente encuentran aplicación particular en el contexto de la presente invención, por ejemplo, la proteína E1 del SFV y la proteína G del VSV.

45 El uso de los Dominios de Traslocalización (de referencia) presentados en la Tabla (a continuación) incluye el uso de sus variantes de secuencia. Una variante puede comprender una o más sustituciones conservativas de ácido nucleico y/ o eliminaciones o inserciones de ácido nucleico, siempre que la variante posea la función de traslocalización requerida. Una variante también puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos y/ o eliminaciones o inserciones de aminoácidos, siempre que la variante posea la función de traslocalización requerida.

Fuente de Dominio de Traslocalización	Residuos de aminoácido	Referencias
Toxina de la difteria	194-380	Silverman et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 22524-22532
		London E., 1992, Biochem. Biophys. Acta., 1113, 25-51

Fuente de Dominio de Traslocalización	Residuos de aminoácido	Referencias
Dominio II de <i>pseudomonas</i>	405-613	Prior et al., 1992, Biochemistry 31, 3555-3559
Exotoxina		Kihara & Pastan, 1994, Bioconj Chem. 5, 532-538
Hemaglutinina de virus de la gripe	GLFGAIAGFIENGWE GMIDGWYG, y sus variantes	Plank et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918-12924
		Wagner et al., 1992, PNAS, 89, 7934-7938
		Murata et al., 1992, Biochemistry 31, 1986-1992
Proteína fusogénica de virus del bosque Semliki	Dominio de traslocalización	Kielian et al., 1996, J Cell Biol. 134(4), 863-872
Glicoproteína G del virus de estomatitis vesicular	118-139	Yao et al., 2003, Virology 310(2), 319-332
Proteína F de virus SER	Dominio de traslocalización	Seth et al., 2003, J Virol 77(11) 6520-6527
Glicoproteína de envoltura de virus Foamy	Dominio de traslocalización	Picard-Maureau et al., 2003, J Virol. 77(8), 4722-4730

Los polipéptidos de la presente invención pueden comprender adicionalmente un dominio que facilite la traslocalización. Dicho dominio facilita la administración de la proteasa no citotóxica al citosol de la célula diana y se describe, por ejemplo, en las patentes WO 08/008803 y WO 08/008805.

- 5 A modo de ejemplo, los dominios facilitadores de traslocalización adecuados incluyen un dominio de péptido fusogénico de virus de envoltura, por ejemplo, los dominios de péptido fusogénico adecuados incluyen el dominio de péptido fusogénico de virus de la gripe (p.ej., el dominio de péptido fusogénico de virus de la gripe de 23 aminoácidos), el dominio de péptido fusogénico de alfavirus (p.ej., el dominio de péptido fusogénico de virus del bosque Semliki de 26 aminoácidos), el dominio de péptido fusogénico de vesiculovirus (p.ej., el dominio de péptido fusogénico de virus de estomatitis vesicular de 21 aminoácidos), el dominio de péptido fusogénico de respirovirus (p.ej., el dominio de péptido fusogénico de virus Sendai de 25 aminoácidos), el dominio de péptido fusogénico de morbilivirus (p.ej., el dominio de péptido fusogénico de virus del moquillo canino de 25 aminoácidos), el dominio de péptido fusogénico de avulavirus (p.ej., el dominio de péptido fusogénico de virus de enfermedad de Newcastle de 25 aminoácidos), el dominio de péptido fusogénico de henipavirus (p.ej., el dominio de péptido fusogénico de virus Hendra de 25 aminoácidos), el dominio de péptido fusogénico de metapneumovirus (p.ej., el dominio de péptido fusogénico de metapneumovirus humano de 25 aminoácidos) o un dominio de péptido fusogénico de espumavirus, tal como el dominio de péptido fusogénico de virus foamy de simio; o fragmentos o variantes de los mismos.

A modo de ejemplo adicional, un dominio facilitador de traslocalización puede comprender un dominio H_{CN} de toxina clostridial o un fragmento o variante del mismo. Más detalladamente, un dominio facilitador de traslocalización H_{CN} de toxina clostridial puede tener una longitud de al menos 200 aminoácidos, al menos 225 aminoácidos, al menos 250 aminoácidos, al menos 275 aminoácidos. En este aspecto, un dominio facilitador de traslocalización H_{CN} de toxina clostridial tiene una longitud de como mucho 200 aminoácidos, como mucho 225 aminoácidos, como mucho 250 aminoácidos, o como mucho 275 aminoácidos. Los ejemplos específicos (de referencia) incluyen:

- Neurotoxina botulínica de tipo A – residuos de aminoácido (872-1110)
- 25 Neurotoxina botulínica de tipo B – residuos de aminoácido (859-1097)
- Neurotoxina botulínica de tipo C – residuos de aminoácido (867-1111)

Neurotoxina botulínica de tipo D – residuos de aminoácido (863-1098)

Neurotoxina botulínica de tipo E – residuos de aminoácido (846-1085)

Neurotoxina botulínica de tipo F – residuos de aminoácido (865-1105)

Neurotoxina botulínica de tipo G – residuos de aminoácido (864-1105)

5 Neurotoxina del tétanos – residuos de aminoácido (880-1127)

Las posiciones de secuencia anteriores pueden variar ligeramente según el serotipo/ subtipo, y ejemplos adiciones de dominios H_{CN} de toxina clostridial adecuados (de referencia) incluyen:

Neurotoxina botulínica de tipo A – residuos de aminoácido (874-1110)

Neurotoxina botulínica de tipo B – residuos de aminoácido (861-1097)

10 Neurotoxina botulínica de tipo C – residuos de aminoácido (869-1111)

Neurotoxina botulínica de tipo D – residuos de aminoácido (865-1098)

Neurotoxina botulínica de tipo E – residuos de aminoácido (848-1085)

Neurotoxina botulínica de tipo F – residuos de aminoácido (867-1105)

Neurotoxina botulínica de tipo G – residuos de aminoácido (866-1105)

15 Neurotoxina del tétanos – residuos de aminoácido (882-1127)

Cualquiera de los dominios facilitadores descritos anteriormente puede combinarse con cualquiera de los péptidos de dominio de traslocalización descritos previamente que sean adecuados para uso en la presente invención. De este manera, a modo de ejemplo, un dominio facilitador no clostridial puede combinarse con un péptido de dominio de traslocalización no clostridial o con un péptido de dominio de traslocalización clostridial. Alternativamente, un dominio facilitador de traslocalización HCN de toxina clostridial puede combinarse con un péptido de dominio de traslocalización no clostridial. Alternativamente, un dominio facilitador HCN de toxina clostridial puede combinarse con un péptido de dominio de traslocalización clostridial, los ejemplos de los cuales incluyen:

Neurotoxina botulínica de tipo A – residuos de aminoácido (449-1110)

Neurotoxina botulínica de tipo B – residuos de aminoácido (442-1097)

25 Neurotoxina botulínica de tipo C – residuos de aminoácido (450-1111)

Neurotoxina botulínica de tipo D – residuos de aminoácido (446-1098)

Neurotoxina botulínica de tipo E – residuos de aminoácido (423-1085)

Neurotoxina botulínica de tipo F – residuos de aminoácido (440-1105)

Neurotoxina botulínica de tipo G – residuos de aminoácido (447-1105)

30 Neurotoxina del tétanos – residuos de aminoácido (458-1127)

Homología de secuencia:

Se puede usar cualquiera de una variedad de métodos de alineamiento de secuencia para determinar el porcentaje de identidad, que incluye, sin limitación, métodos globales, métodos locales y métodos híbridos, tales como, p.ej., métodos de estrategia de segmentos. Los protocolos para determinar el porcentaje de identidad son procedimientos de rutina al alcance del especialista en la técnica. Los métodos globales alinean secuencias desde el principio hasta el final de la molécula y determinan el mejor alineamiento sumando puntuaciones de pares de residuos individuales e imponiendo penalizaciones de hueco. Los ejemplos no limitativos incluyen, p.ej., CLUSTAL W, véase, p.ej., Julie D. Thompson et al., "CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position- Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice", 22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994); y el refinado iterativo, véase, p.ej., Osamu Gotoh, "Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments", 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996). Los métodos locales alinean secuencias identificando una o más estructuras conservadas compartidas por todas las secuencias de entrada. Los métodos no limitativos incluyen, p.ej., el de Match-box, véase, p.ej., Eric Depiereux y Ernest Feytmans, "Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences", 8(5) CABIOS 501 -509 (1992); el muestreo de Gibbs, véase, p.ej., C. E. Lawrence et al., "Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple

Alignment”, 262(5131) Science 208-214 (1993); Align-M, véase, p.ej., Ivo Van Walle et al., “Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences”, 20(9) Bioinformatics:1428-1435 (2004).

5 Por tanto, el porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986 y Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-19, 1992. Resumidamente, se alinean dos secuencias de aminoácido para optimizar las puntuaciones de alineamiento usando una penalización de apertura de hueco de 10, una penalización de extensión de hueco de 1, y la matriz de puntuación “blosum 62” de Henikoff y Henikoff (ver anterior) como se indica a continuación (los aminoácidos se indican mediante los códigos estándar de una letra).

Puntuaciones de alineación para determinar la identidad de secuencia

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

A 4

R-1 5

N-2 0 6

D-2-2 1 6

15 C 0-3-3-3 9

Q-1 1 0 0-3 5

E-1 0 0 2-4 2 5

G 0 -2 0 -1 -3 -2 -2 6

H -2 0 1 -1 -3 0 0 -2 8

20 I -1 -3 -3 -3 -1 -3 -3 -4 -3 4

L -1 -2 -3 -4 -1 -2 -3 -4 -3 2 4

K -1 2 0 -1 -3 1 1 -2 -1 -3 -2 5

M -1 -1 -2 -3 -1 0 -2 -3 -2 1 2 -1 5

F -2 -3 -3 -3 -2 -3 -3 -3 -1 0 0 -3 0 6

25 P -1 -2 -2 -1 -3 -1 -1 -2 -2 -3 -3 -1 -2 -4 7

S 1 -1 1 0 -1 0 0 0 -1 -2 -2 0 -1 -2 -1 4

T 0 -1 0 -1 -1 -1 -1 -2 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1 1 5

W -3 -3 -4 -4 -2 -2 -3 -2 -2 -3 -2 -3 -1 1 -4 -3 -2 1 1

Y -2 -2 -2 -3 -2 -1 -2 -3 2 -1 -1 -2 -1 3 -3 -2 -2 2 7

30 V 0 -3 -3 -3 -1 -2 -2 -3 -3 3 1 -2 1 -1 -2 -2 0 -3 -1 4

El porcentaje de identidad se calcula entonces como:

$$\frac{\text{Número total de coincidencias idénticas}}{\text{[longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga con el fin de alinear la dos secuencias]}} \times 100$$

35

40 Los polipéptidos sustancialmente homólogos se caracterizan por tener una o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios preferiblemente son de naturaleza menor, que son sustituciones de aminoácido conservativas (ver más adelante) y otras sustituciones que no afectan significativamente al plegamiento o a la actividad del polipéptido, pequeñas eliminaciones, típicamente de uno hasta aproximadamente 30

aminoácidos; y pequeñas extensiones amino- o carboxi-terminales, tales como un residuo de metionina amino-terminal, un péptido ligando pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una etiqueta de afinidad.

Sustituciones de aminoácidos conservativas

5	Básico:	arginina
		lisina
		histidina
	Ácido:	ácido glutámico
		ácido aspártico
10	Polar:	glutamina
		asparagina
	Hidrofóbico:	leucina
		isoleucina
		valina
15	Aromático:	fenilalanina
		triptófano
		tirosina
20	Pequeño:	glicina
		alanina
		serina
		treonina
		metionina

Además de los 20 aminoácidos estándar, se pueden sustituir aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxi prolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y α -metil serina) por residuos de aminoácido de los polipéptidos de la presente invención. Un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no son codificados por el código genético, y aminoácidos no naturales pueden ser sustituidos por residuos de aminoácido de polipéptido clostridial. Los polipéptidos de la presente invención también pueden comprender residuos de aminoácido no naturales.

Los aminoácidos no naturales incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metano-prolina, cis-4-hidroxi prolina, trans-4-hidroxi prolina, N-metilglicina, alotreonina, metil-treonina, hidroxietilcisteína, hidroetilhomo-cisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido piperídico, terc-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. En la técnica se conocen varios métodos para incorporar residuos de aminoácido no naturales a proteínas. Por ejemplo, se puede emplear un sistema *in vitro* cuando se suprimen mutaciones sin sentido usando tARNs supresores aminoacilados químicamente. Los métodos para sintetizar aminoácidos y tARN aminoacilante son conocidos en la técnica. La transcripción y la traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se llevan a cabo en un sistema libre de células que comprende extracto de *E. coli* S30 y enzimas y otros reactivos disponibles comercialmente. Las proteínas se purifican mediante cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113: 2722, 1991; Ellman et al., Methods Enzymol. 202: 301, 1991; Chung et al., Science 259: 806-9, 1993; y Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10145-9, 1993). En un segundo método, la traducción se lleva a cabo en *Xenopus* oocytes mediante microinyección de ARNm mutado y tARNs supresores aminoacilados químicamente (Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271: 19991-8, 1996). En un tercer método, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que va a ser reemplazado (p.ej., fenilalanina) y en presencia de el(los) aminoácido(s) no natural(es) deseado(s) (p.ej., 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina, o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido no natural se incorpora al polipéptido en lugar de su contrapartida natural. Véase, Koide et al., Biochem. 33: 7470-6, 1994. Los residuos de aminoácido naturales pueden convertirse en especies que existen de forma natural mediante modificación química *in vitro*. La modificación química se puede combinar con mutagénesis sito-dirigida para expandir aún más el rango de sustituciones (Wynn and Richards, Protein Sci. 2: 395-403, 1993).

Un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no son codificados por el código genético, aminoácidos que no existen en la naturaleza, y aminoácidos no naturales pueden ser sustituidos por residuos de aminoácido de los polipéptidos de la presente invención.

5 Los aminoácidos esenciales de los polipéptidos de la presente invención se pueden identificar de acuerdo a procedimientos conocidos en la técnica, tal como la mutagénesis sito-dirigida o la mutagénesis de escaneo de alanina (Cunningham and Wells, Science 244: 1081-5, 1989). Los sitios de interacción biológica también se pueden determinar mediante análisis físico de la estructura, como se ha determinado mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcado de fotoafinidad, en combinación con mutación de los aminoácidos del sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos et al., Science 255: 306-12, 1992; Smith et al., J. Mol. Biol. 224: 899-904, 1992; Wlodaver et al., FEBS Lett. 309: 59-64, 1992. Las identidades de los aminoácidos esenciales también se pueden deducir a partir del análisis de las homologías con componentes relacionados (p.ej., la traslocalización de componentes de proteasa) de los polipéptidos de la presente invención.

15 Se pueden realizar múltiples sustituciones de aminoácidos y se pueden evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis y escrutinio, tales como los descritos por Reidhaar-Olson and Sauer (Science 241: 53-7, 1988) o por Bowie y Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-6, 1989). Resumidamente, estos autores describen métodos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones de un polipéptido, hacer una selección de polipéptido funcional, y a continuación secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros métodos que pueden usarse incluyen la presentación de fagos (p.ej., Lowman et al., Biochem. 30: 10832-7, 1991; Ladner et al., Patente de EE.UU. n° 5.223.409; Huse, WIPO Publicación WO 92/06204) y la mutagénesis dirigida a región (Derbyshire et al., Gene 46: 145, 1986; Ner et al., DNA 7:127, 1988).

20 Se pueden realizar múltiples sustituciones de aminoácidos y se pueden evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis y escrutinio, tales como los descritos por Reidhaar-Olson and Sauer (Science 241: 53-7, 1988) o por Bowie y Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-6, 1989). Resumidamente, estos autores describen métodos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones de un polipéptido, hacer una selección de polipéptido funcional, y a continuación secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros métodos que pueden usarse incluyen la presentación de fagos (p.ej., Lowman et al., Biochem. 30: 10832-7, 1991; Ladner et al., Patente de EE.UU. n° 5.223.409; Huse, WIPO Publicación WO 92/06204) y la mutagénesis dirigida a región (Derbyshire et al., Gene 46: 145, 1986; Ner et al., DNA 7:127, 1988).

30 **Figura 1 – Purificación de proteína de la fusión LH_N/D-CT-CST28**

Usando la metodología descrita en el Ejemplo 5, se purificó una proteína de fusión LH_N/D-CT-CST28 a partir de células de *E. coli* BL21 (DE3). Resumidamente, los productos solubles obtenidos después de una disrupción celular fueron aplicados a una columna de captura por afinidad cargada de níquel. Las proteínas retenidas fueron eluidas con imidazol 200 mM, tratadas con enteroquinasa para activar la proteína de fusión y a continuación se volvieron a aplicar a una segunda columna de captura por afinidad cargada de níquel. Las muestras del procedimiento de purificación fueron analizadas mediante SDS-PAGE. *Calle 1*: eluyente de la primera columna de Sepharose quelante de níquel, *Calle 2*: eluyente de la segunda columna de Sepharose quelante de níquel, *Calle 3*: eluyente de la segunda columna de Sepharose quelante de níquel en condiciones reductoras, *Calle 4*: marcadores de masa molecular (kDa).

40 **Figura 2 – Purificación de la proteína de fusión LH_N/A-CT-SST14**

Usando la metodología descrita en el Ejemplo 6, se purificó una proteína de fusión LH_N/A-CT-SST14 a partir de células de *E. coli* BL21 (DE3). Resumidamente, los productos solubles obtenidos después de una disrupción celular fueron aplicados a una columna de captura por afinidad cargada de níquel. Las proteínas retenidas fueron eluidas con imidazol 200 mM, tratadas con Factor Xa para activar la proteína de fusión y a continuación se volvieron a aplicar a una segunda columna de captura por afinidad cargada de níquel. Las muestras del procedimiento de purificación fueron analizadas mediante SDS-PAGE. *Calle 1*: eluyente de la primera columna de Sepharose quelante de níquel, *Calle 2*: Marcadores de masa molecular (kDa), *Calles 3-4*: eluyente de la segunda columna de Sepharose quelante de níquel en condiciones no reductoras, *Calles 5-6*: eluyente de la segunda columna de Sepharose quelante de níquel en condiciones reductoras.

50 **Figura 3 – Actividad de SST-LH_N/A en células endocrinas cultivadas (AtT20)**

La Figura 3a muestra la inhibición de la secreción de ACTH por SST-LH_N/A, y la Figura 3b muestra la correspondiente ruptura de SNAP-25 por SST-LH_N/A.

Figura 4 – Actividad de SST-LH_N/D en células endocrinas cultivadas (GH3)

55 La Figura 4 muestra el efecto de la liberación de hormona del crecimiento desde células GH3. Mayores dosis de administración de SST-LH_N/D dan como resultado una mayor inhibición de la liberación de hormona del crecimiento.

Figura 5 – Actividad de CP-GHRH-LHD en los niveles de IGF-1 de rata *in vivo*

La Figura 5 muestra los efectos de la administración i.v. de CP-GHRH-LHD (SXN101000) sobre los niveles de IGF-1 de rata 5 días después del tratamiento, en comparación con un control solo de vehículo.

Figura 6 - Actividad de CP-GHRH-LHD en los niveles de IGF-1 de rata *in vivo*

- 5 La Figura 6 muestra los efectos de la administración i.v. de CP-GHRH-LHD (SXN101000) sobre los niveles de IGF-1 de rata desde el día 1 hasta 8 días después del tratamiento en comparación con un control solo de vehículo. Debido al bloqueo de la cánula en los días 9 y 10 se tuvo un número n demasiado pequeño para ser considerado.

Figura 7 – Actividad de CP-GHRH-LHD sobre los niveles de hormona de crecimiento de rata *in vivo*

- 10 La Figura 7b muestra los efectos de la administración i.v. de CP-GHRH-LHD (SXN101000) sobre los niveles de hormona de crecimiento de rata 5 días después del tratamiento en comparación con el control solo de vehículo (Figura 7a) y con infusión de octreotide (Figura 7c).

SEQ ID NOs

1. Secuencia de ADN de LH_N/A
2. Secuencia de ADN de LH_N/B
- 15 3. Secuencia de ADN de LH_N/C
4. Secuencia de ADN de LH_N/D
5. Secuencia de ADN del ligando CP-EN-GS15-SST28 humano
6. Secuencia de ADN del ligando CT-GS20-CST28 humano
7. Secuencia de proteína de la fusión CP-CST14-GS20-LHD
- 20 8. Secuencia de proteína de la fusión CP-CST14-GS30-LHD
9. Secuencia de proteína de la fusión CP-CST28-GS20-LHD
10. Secuencia de proteína de la fusión CP-CST28-GS30-LHD
11. Secuencia de proteína de la fusión CP-SST14-GS20-LHD
12. Secuencia de proteína de la fusión CP-SST14-GS30-LHD
- 25 13. Secuencia de proteína de la fusión CP-SST28-GS20-LHD
14. Secuencia de proteína de la fusión CP-SST28-GS30-LHD
15. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST14-GS20-LHD
16. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST14-GS30-LHD
17. Secuencia de ADN de la fusión CT-CST28-GS20-LHD
- 30 18. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST28-GS20-LHD
19. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST28-GS30-LHD
20. Secuencia de proteína de la fusión CT-SST14-GS15-L(#Fxa)HD
21. Secuencia de proteína de la fusión CT-SST14-GS30-LHD
22. Secuencia de proteína de la fusión CT-SST28-GS20-LHD
- 35 23. Secuencia de proteína de la fusión CT-SST28-GS30-LHD
24. Secuencia de proteína de la fusión CT-SST14-GS35-LHC
25. Secuencia de ADN de la fusión CP-GS15-SST28-LHA
26. Secuencia de proteína de la fusión CP-GS15-SST28-LHA
27. Secuencia de proteína de la fusión CT-SST28-GS15-LHB

- 28. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST14-GS20-LHC
- 29. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST17-GS25-LHC
- 30. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST29-GS15-LHA
- 31. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST29-GS30-LHB
- 5 32. Secuencia de ADN de IgA-H_Ntet
- 33. Secuencia de proteína de la fusión CT-GHRP-LHC
- 34. Secuencia de proteína de la fusión CT-GHRH-LHD
- 35. Secuencia de proteína de la fusión CT-GHRP-LHD
- 36. Secuencia de proteína de la fusión CT-grelina-LHA
- 10 37. Secuencia de proteína de la fusión IgA-H_Ntet-CT-SST14
- 38. Secuencia de proteína de la fusión IgA-H_Ntet-CT-GHRP
- 39. Secuencia de proteína de la fusión CT-grelina S3W-LHA
- 40. Secuencia de proteína de la fusión CT-GRP-LHD
- 41. Secuencia de proteína de la fusión CT-GRP-LHB
- 15 42. Secuencia de proteína de la fusión CP-qGHRH29-LHD
- 43. Secuencia de proteína de la fusión CP-qGHRH-LHA
- 44. Secuencia de proteína de la fusión CP-qGHRH-LHC
- 45. Secuencia de proteína de la fusión CP-qGHRH-LHD
- 46. Secuencia de proteína de la fusión CP-qGHRH-LHD N10-PL5
- 20 47. Secuencia de proteína de la fusión CP-qGHRH-LHD N10-HX12
- 48. Secuencia de proteína de la fusión CP-UTS-LHA
- 49. Secuencia de proteína de LH_N/A
- 50. Secuencia de proteína de LH_N/B
- 51. Secuencia de proteína de LH_N/C
- 25 52. Secuencia de proteína de LH_N/D
- 53. Secuencia de proteína de IgA-H_Ntet
- 54. Péptido Octreotide sintetizado
- 55. Péptido agonista GHRH sintetizado
- 56. Péptido antagonista GHRH sintetizado
- 30 57. Secuencia de proteína de la fusión CP-MCH-LHD
- 58. Secuencia de proteína de la fusión CT-KISS-LHD
- 59. Secuencia de proteína de la fusión CT-PrRP-LHA
- 60. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_1-27-LHD
- 61. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_1-28-LHD
- 35 62. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_1-29-LHD
- 63. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_1-44-LHD
- 64. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_1-40-LHD

65. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala9-LHD
 66. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala22-LHD
 67. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Lys11_1-29-LHD
 68. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Lys11_Arg12_1-29-LHD
 5 69. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Asn11_1-29-LHD
 70. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Lys20_1-29-LHD
 71. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Lys11_Lys20_1-29-LHD
 72. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Asn20_1-29-LHD
 73. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Asn12_1-29-LHD
 10 74. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Asn21_1-29-LHD
 75. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Glu_7_1-29-LHD
 76. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Glu_10_1-29LHD
 77. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Glu_13_1-29-LHD
 78. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8-LHD
 15 79. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Glu8_1-29-LHD
 80. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala15_1-27-LHD
 81. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala15-LHD
 82. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Ala15_1-29-LHD
 83. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_9_15_22_27-LHD
 20 84. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_9_15_22-LHD
 85. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_HVQAL_1-32-LHD
 86. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_HVSAL_1-29-LHD
 87. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_HVTAL_1-29-LHD
 88. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_QALN-LHD
 25 89. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_QAL-LHD
 90. Secuencia de proteína de la fusión CP-hGHRH29 N8A M27L-LHD
 91. Secuencia de proteína de la fusión CP-hGHRH29 N8A K12N M27L-LHD
 92. Secuencia de proteína de la fusión N-terminal-hGHRH29 N8A M27L-LHD
 93. Secuencia de proteína de la fusión GnRH-C humana
 30 94. Secuencia de proteína de la fusión GnRH -D GS 20 humana

Sumario de ejemplos

- Ejemplo 1 Preparación de una construcción de cadena principal de LHA
 Ejemplo 2 Construcción de LHA-CP-SST28
 Ejemplo 3 Expresión y purificación de una proteína de fusión LHA-CP-SST28
 35 Ejemplo 4 Construcción de LHD-CT-CST28
 Ejemplo 5 Expresión y purificación de una proteína de fusión LHD-CT-CST28
 Ejemplo 6 Conjugación química de LH_N/A aTM de SST

Ejemplo 7 Actividad de SST-LHA en células neuroendocrinas cultivadas (AtT20)

Ejemplo 8 Actividad de SST-LHD en células neuroendocrinas cultivadas (GH3)

Ejemplo 9 Método para aliviar síntomas acromegálicos reduciendo los niveles elevados de GH e IGF-1 consecuencia de un adenoma pituitario

5 Ejemplo 10 Método para normalizar dedos hirsutos hinchados reduciendo los niveles elevados de GH e IGF-1 consecuencia de un adenoma pituitario

Ejemplo 11 Método para aliviar las consecuencias de un adenoma pituitario secretor de hormona de crecimiento re-emergente

Ejemplo 12 Método para tratar pacientes acromegálicos resistentes a análogos de somatostatina

10 Ejemplo 13 Método para tratar la enfermedad de Cushing en pacientes intolerantes a análogos de somatostatina

Ejemplo 14 Método para revertir la impotencia sexual femenina a través del tratamiento de prolactinoma

Ejemplo 15 Método para recuperar la pérdida de peso a través del tratamiento de insulinoma

Ejemplo 16 Método para tratar el glucagonoma

Ejemplo 17 Método para tratar la diarrea y el rubor producido por el VIPoma

15 Ejemplo 18 Método para tratar el gastrinoma

Ejemplo 19 Método para tratar la tirotoxicosis producida por un tirotrofinoma

Ejemplo 20 Método para tratar el hinchamiento recurrente de tejidos blandos producido por la acromegalia

Ejemplo 21 Método para tratar el hirsutismo facial excesivo producido por la enfermedad de Cushing

Ejemplo 22 Método para tratar la galactorrea masculina producida por el prolactinoma

20 Ejemplo 23 Método para tratar síntomas múltiples producidos por el insulinoma

Ejemplo 24 Método para tratar pacientes acromegálicos resistentes a análogos de somatostatina

Ejemplo 25 Método para tratar la enfermedad de Cushing en pacientes intolerantes a análogos de somatostatina

Ejemplo 26 Método para revertir la impotencia sexual femenina a través del tratamiento del prolactinoma

Ejemplo 27 Método para tratar la enfermedad de Cushing

25 Ejemplo 28 Método para tratar el gastrinoma

Ejemplo 29 Método para aliviar los síntomas acromegálicos reduciendo los niveles elevados de GH e IGF-1 resultantes de un adenoma pituitario

Ejemplo 30 Método para tratar pacientes acromegálicos resistentes a análogos de somatostatina

Ejemplo 31 Método para tratar la acromegalia

30 Ejemplo 32 Actividad de CP-GHRH-LHD en los niveles de IGF-1 de rata *in vivo*

Ejemplo 33 Actividad de CP-GHRH-LHD en los niveles de IGF-1 de rata *in vivo*

Ejemplo 34 Actividad de CP-GHRH-LHD en los niveles de hormona de crecimiento de rata *in vivo*

SEQ IDs

1. Secuencia de ADN de LH_N/A

ggatccATGGAGTTCGTTAACAAACAGTTCAACTATAAAGACCCAGTTAACGGTGTGACATTGCTTAC
 ATCAAAATCCCGAACGCTGGCCAGATGCAGCCGGTAAAGGCATTCAAAATCCACAACAAAATCTGGGTT
 ATCCCGGAACGTGATACCTTTACTAACCCGGGAAGAGGTGACCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAACAG
 GTGCCGTATCTTACTATGACTCCACCTACCTGTCTACCGATAACGAAAAGGACAACCTGAAAGGT
 GTTACTAAACTGTTTCGAGCGTATTACTCCACCGACCTGGGCCGTATGCTGCTGACTAGCATCGTTCCG
 GGTATCCCGTTCCTGGGGCGGTTCTACCATCGATACCGAACTGAAAGTAATCGACACTAATGCATCAAC
 GTTATTCAGCCGGACGGTTCCTATCGTTCGGAAGAATGAACTGGTGATCATCGGCCGCTCTGCTGAT
 ATCATCCAGTTCGAGTGTCTGAGCTTTGGTACGAAGTTCGAACTCACCCGTAACGGCTACGGTTC
 ACTCAGTACATCCGTTTCTCTCCGACTTCACCTTCGGTTCGTTTGAAGAATCCCTGGAAGTAGACACGAAC
 CCACTGCTGGGGCGCTGGTAAATTCGCAACTGATCCTGCGGTTACCCTGGCTCACGAACGATTTCATGCA
 GGCCACCGCCTGTACGGTATCGCCATCAATCCGAACCGTGTCTTCAAAGTTAACACCAACCGGTATTAC
 GAGATGTCGGTCTGGAAGTTAGCTTCGAAGAATGCGTACTTTTGGCGGTACGACGCTAAATTCATC
 GACTCTCTGCAAGAAAACGAGTTCGGTCTGTACTACTATAACAAGTTCAAAGATATCGCATCCACCCCTG
 AACAAAGCGAAATCCATCGTGGGTACCCTGCTTCTCTCCAGTACATGAAGAACGTTTTTAAAGAAAA
 TACCTGCTCAGCGAAGACACCTCCGGCAAATTCCTGTAGACAAGTTGAAATTCGATAAACTTTACAAA
 ATGCTGACTGAAATTTACACCGAAGACAACCTTCGTTAAGTTCCTTAAAGTTCTGAACCGCAAAACCTAT
 CTGAACTTCGACAAGGCAGTATTCAAAATCAACATCGTCCGAAAGTTAACTACACTATCTACGATGGT
 TTCACCTGCGTAAACCAACCTGGCTGCTAATTTTAAACGGCCAGAACACGGAAATCAACAACATGAAC
 TTCACAAAACCTGAAAACTTCACTGGTCTGTTTCGAGTTTACAAGCTGCTGTGCGTCGACGGCCTCAT
 ACCTCCAAAATAAATCTGACGATGACGATAAAAACAAAGCGTGAACCTGCAGTGTATCAAGGTTAAC
 AACTGGGATTTATCTTCAGCCCGAGTGAAGACAACCTCACCAACGACCTGAACAAAGGTGAAGAAATC
 ACCTCAGATACTAACATCGAAGCAGCCGAAAGAAACATCTCGCTGGACCTGATCCAGCAGTACTACCTG
 ACCTTTAATTTGCAACAACGAGCCGAAACATTTCTATCGAAAACCTGAGCTCTGATATCATCGGCCAG
 CTGGAACCTGATCCGGAACATCGAACGTTTCCCAAACGGTAAAAAGTACGAGCTGGACAAATATACCATG
 TTCCACTACCTGCGCCGCGCAGGAATTTGAACACGGCAAATCCCGTATCGCACTGACTAATCCGGTTAAC
 GAAGCTCTGCTCAACCCGTCCTGTATACACCTTCTCTAGCGACTACGTGAAAAAGGTCAACAAA
 GCGACTGAAGCTGCAATGTTCTTGGGTTGGGTTGAACAGCTTGTATGATTTTACCAGCAGAGCGTCC
 GAAGTATCTACTACCGACAAAATGCGGATATCATATCATATCCCGTACATCGGTCCGGCTCTGAAC
 ATTGGCAACTGATGTCGACAAAGACGACTTCGTTGGCGCACTGATCTTCTCCGGTCCGGTATCCTGCTG
 GAGTTTATCCCGGAAATCGCCATCCCGTACTGGGCACCTTTGCTCTGGTTTCTTACATGCAAACAAG
 GTTCTGACTGTACAAAACATCGACAACCGCTGAGCAAACGTAACGAAAAATGGGATGAAGTTTACAAA
 TATATCGTGACCAACTGGCTGGCTAAGTTAATACTCAGATCGACCTCATCCGCAAAAAAATGAAAGAA
 GCCTGGAAAACCCAGCGGAAGCTACCAAGGCAATCATTAACTACCAGTACAACCAAGTACACCGAGGAA
 GAAAAAACAACATCAACTTCAACATCGACGATCTGCTTAACTGAACGAATCCATCAACAAGACT
 ATGATCAACATCAACAAGTTCTGAAACAGTGTCTGTAAGCTATCTGATGAACTCCATGATCCCGTAC
 GGTGTTAAACGCTCTGGAGGACTTCGATGCGTCTCTGAAAGACGCCCTGCTGAAATACATTTACGACAAC
 CGTGGCACTCTGATCGGTGAGGTTGATCGTCTGAAAGGACAAAGTGAACAATACCTTATCGACCGACATC
 CCTTTTCAGCTCAGTAAATATGTCGATAACCAACGCCCTTTTGTCCACTtaataaagctt

2. Secuencia de ADN de LH₁/B

GGATCCATGCGGTTACCATCAACAACCTTCAACTACAACGACCCGATCGACAACAACAACATCATTATG
 ATGGAACCGCCGTTTCGCACGTGGTACCGGACGTTACTACAAGGCTTTTAAAGATCACCGACCGTATCTGG
 ATCATCCCGGAACGTTACACCTTCGGTTACAAACCTGAGGACTTCAACAAGAGTAGCGGGATTTTCAAT
 CGTGACGCTGCGAGTACTATGATCCAGATTATCTGAATACCAACGATAAGAAGAACATATTCCTTCAG
 ACTATGATTAACCTCTTCAACCGTATCAAAAGCAAACCGCTCGGTGAAAAACTCCTCGAAATGATTATC
 AACGGTATCCCGTACCTCGGTGACCGTCTGTCCTCCGCTTGAAGAGTTCAACACCAACATCGCAAGCGTC
 ACCGTCAACAAAACCTCATCAGCAACCCAGTGAAAGTCAAGCTGAAAAAGGTTATCTTCGCAAAACCTCATC
 ATCTTCGGTCCGGTCCGGTCTCAACGAAAAAGCAACCATCGACATCGGTATCCAGAACCACCTTCGCA
 AGCCGTGAAGGTTTCGGTGGTATCATGCAGATGAAATTCGCCCCGAATACGTGAGTGTCTTCAACAAC
 GTCCAGGAAAAACAAGGTGCAAGCATCTTCAACCGTCTGTTACTTCAGCCACCCGGCACTCATCTTC
 ATGATGAACTCATCCAGTCTTCCAGGTTCTACGGTATCAAAGTTGACGACCTCCCGATCGTCCCG
 AACGAGAAGAAATCTTTCATGCAGAGCACCGACGCAATCCAGGCTGAGGAACTTACACCTTCGGTGGC
 CAAGACCCAAGTATCATAACCCCGTCCACCGACAAAAGCATCTACGACAAAAGTCTCCAGAACCTTCAGG
 GGTATCGTGGACAGACTCAACAAAGTCTCGTCTGCATCAGCGACCCGAACATCAATATCAACATATAC
 AAGAACAAGTTCAAAGACAAGTACAAATTCGTTCGAGGACAGCGAAGGCAATACAGCATCGACGTAGAA
 AGTTTCGACAAGCTTCAAAAAGCCTCATGTTTCGGTTTCAACCGAAACCAACATCGCCGAGAATCAAG
 ATCAAGACAAGGCAAGTTACTTTCAGCGACAGCCTCCCGCTGTCAAATCAAGAACCTCTTAGACAAC
 GAGATTTACACAATGAAGAGGGCTTCAACATCAGTGACAAAGACATGGAGAAGGAATACAGAGGTCAG

AAACAAGGCTATCAACAAAACAGGCATACGAGGAGATCAGCAAAGAACACCTCGCAGTCTACAAGATCCAG
 ATGTGCGTGCACGGCATCATTACCTCCAAAATAAATCTGACGATGACGATAAAAACAAAACGGCTGAAC
 CTGCAGTGCATCGACGTTGACAAACGAAGACCTGTTCTTCATCGCTGACAAAAACAGCTTCAGTGACGAC
 CTGAGCAAAAACGAACGATCGAATACAACACCCAGAGCAACTACATCGAAAAACGACTTCCCGATCAAC
 GAACGATCCTGGACACCGACCTGATAAGTAAAAATCGAACTGCGGAGCGAAAAACCCGAAAGTCTGACC
 GACTTCAACGTTGACGTTCCGGTTTACGAAAAACAGCCGGCTATCAAGAAAAATCTTACCAGCAAAAAAC
 ACCATCTCCAGTACCTGTACAGCCAGACCTTCCCGCTGGACATCCGTGACATCAGTCTGACCAGCAGT
 TTCGACGACGCTCTGCTGTTACGCAACAAAGTTTACAGTTTCTTTCAGCATGGACTACATCAAAAACCGCT
 AACAAAGTTGTTGAAGCAGGGCTGTTCCGTGGTGGGTTAAACAGATCGTTAACGACTTCGTTATCGAA
 GCTAACAAAAGCAACACTATGGACAAAATCGCTGACATCAGTCTGATCGTTCGTACATCGGTCTGGCT
 CTGAACGTTGGTAAACGAAACCCCTAAAGGTAACCTTTGAAAAACGCTTTCGAGATCGCTGGTGCAAGCATC
 CTGCTGGAGTTCATCCCGAACTGCTGATCCCGGTTGTTGGTGTCTTCTGCTGGAAAGTTACATCGAC
 AACAAAAACAAGATCATCAAAACCATCGACAACGCTCTGACCAACGTAACGAAAAATGGAGTGATATG
 TACGGTCTGATCGTTGCTCAGTGGCTGAGCACCGTCAACACCCAGTCTACACCATCAAGAAGGTATG
 TACAAAGTCTGAACTACCAGGCTCAGGCTCTGGAAGAGATCATCAAATACCGTTACACATCTACAGT
 GAGAAGCAAAAGATCAACACATCAACACTCGACTTCAACGACATCAACAGCAAACTGAACGAAGGTATCAAC
 CAGGCTATCGACAACATCAACAACCTTCAACCGTTGCAGTGTAGCTACCTGATGAAGAAGATGATC
 CCGCTGGCTGTTGAAAAACTGCTGGACTTCGACAACACCCCTGAAAAAGAACCTGCTGAACTACATCGAC
 GAAAAACAAGCTGTACCTGATCCGTAGTCTGAATACGAAAAAGTAAAGTGAACAAATACCTGAAGACC
 ATCATGCCGTTCCGACTGAGTATCTACCAACGACACCATCCTGATCGAAATGTTCAACAAATACAAC
 TCTtaataagctt

3. Secuencia de ADN de LH_N/C

ggatccATGCCGATCACCATCAACAACCTCAACTACAGCGATCCGGTGGATAACAAAAACATCCTGTAC
 CTGGATACCCATCTGAATACCTGGCGAACGAACCGGAAAAAGCGTTTCGTATCACCGGCAACATTTGG
 GTTATCCCGGATCGTTTACGCGTAACAGCAACCCGAATCTGAATAAACCGCGCGTGTACCAGCCCG
 AAAAGCGGTTATTACGATCCGAACTATCTGAGCACCGATAGCGATAAAGATACCTTCCCTGAAAGAAATC
 ATCAAACCTGTTCAAACGCATCAACAGCCGTGAAATGGCGAAGAAGTATCGCTATCGCCTGAGCACCGAT
 ATTCCGTTTCCGGGCAACAACAACACCCCGATCAACACCTTTGATTTTCGATGTGGATTCAACAGCGTT
 GATGTTAAAACCCGCCAGGTTAAACAATTGGGTGAAAAACCGGCAGCATTAAACCGAGCGTGATTATTACC
 GGTCCGCGGAAAAACATTATTGATCCGGAACACAGCACCTTTAAACTGACCAACAACCTTTGCGGCG
 CAGGAAGGTTTGGCGCGCTGAGCATTATTAGCATTAGCCCGCGCTTTATGCTGACCTATAGCAACGCG
 ACCAACGATGTTGGTGAAGGCGTTTTCGCAAAAAGCGAATTTTGATGGACCCGATCCTGATCCTGATG
 CATGAACTGAACCATGCGATGCATAACCTGTATGGCATCGCGATTCCGAACGATCAGACCATTAGCAGC
 GTGACCAGCAACATCTTTACAGCCAGTACAACGTGAAACTGGAATATGCGGAAATCTATGCGTTTGGC
 GGTCCGACCATTTGATCTGATTCCGAAAAGCGCGCGCAAAATCTTCGAAGAAAAGCGCTGGATTACTAT
 CGCAGCATTTGCCAAACGCTCTGAACAGCATTACCACCGGAATCCGAGCAGCTTCAACAAATATATCGGC
 GAATATAAACAGAAACTGATCCGCAAAATCGCTTTGTTGGTGAAGAAGCAGCGCGGAAGTTACCGTTAAC
 CGCAATAAAATTCGTGGAACCTGTACAACGAACTGACCCAGATCTTCAACGAAATTTAACTATGCGAAATC
 TATAACGTGCAGAACCGTAAAATCTACCTGAGCAACGTGTATACCCCGGTGACCGCAATATTCTGGAT
 GATAACGTGTACGATATCCAGAACGGCTTAAACATCCCGAAAAGCAACCTGAACGTTCTGTTTATGGGC
 CAGAACCTGAGCCGTAATCCGGCGCTGCGTAAAGTGAACCCGAAAAACATGCTGTACCTGTTCAACAAA
 TTTTGGCTCGACGCGATTGATGGTCTGAGCCTGTACAACAACCCCTGCAGTGTCTGTAACCTGCTGGTG
 AAAAACACCGATCTGCCGTTTATTGGCGATATCAGCGATGTGAAAAACCGATATCTTCTGCGCAAAGAT
 ATCAACGAAGAAACCGAAGTGATCTACTACCCGGATAACGTGAGCGTTGATCAGGTGATCCTGAGCAAA
 AACACCGAGCAACATGTTGCTGATCTGCTGTATCCGAGCATTTGATAGCGAAAGCGAAATTTCTGCCG
 GCGGAAAACAGGTGTTTACGATAACCGTACCAGAACGTGGATTACCTGAAACAGCTATTACTACCTG
 GAAAGCCAGAAACTGAGCGATAACGTGGAAGATTTTACCTTTACCCGAGCATTGAAGAAGCGCTGGAT
 AACAGCGCGAAAGTTTACACCTATTTTCCGACCCCTGGCGAACAAAGTTAATGCGGGTGTTCAGGGCGGT
 CTGTTTCTGATGTGGGCGAACGATGTGGTGAAGATTTACCACCAACATCCTGCGTAAAGATACCTG
 GATAAAATCAGCGATGTTAGCGGATTTTCCGTATATTGGTCCGGCGCTGAACATTAGCAATAGCGTG
 CGTCTGGCAATTTTACCGAAGCGTTTGGGTTACCGGTGTGACCATTCTGCTGGAAGCGTTTCCGGAA
 TTTACCATTCCGGCTGGTGCCTTTGTGATCTATAGCAAAGTGCAGGAACGCAACGAAATCATCAAA
 ACCATCGATAACTGCCTGGAACAGCGTATTAAACGCTGGAAAGATAGCTATGAATGGATGATGGGCACC
 TGGCTGAGCCGATTTATCACCCAGTTCAACAACATCAGCTACAGATGTACGATAGCCTGAACTATCAG
 GCGGGTGCATTAAGCGAAAAATCGATCTGGAATACAAAAATACAGCGGCAGCGATAAAGAAAAACATC
 AAAAGCCAGGTTGAAAAACCTGAAAAACAGCCTGGATGTGAAAAATTAGCGAAGCGATGAATAACATCAAC
 AAATTCATCCGCGAATGCGACGCTGACCTACCTGTTCAAAAAACATGCTGCGGAAAGTGTATCGATGAACTG
 AACGAATTTGATCGCAACACCAAAGCGAAAACCTGATCAACCTGATCGATAGCCACAACATTTCTGGTG
 GCGGAAGTGGATAAACTGAAAGCGAAAGTTAAACAACGCTTCCAGAACACCATCCCGTTTAAACATCTT
 AGCTATACCAACAACAGCCTGCTGAAAGATATCATCAACGAATCTTCAATtaataagctt

4. Secuencia de ADN de LH_N/D

ggatccATGACGTGGCCAGTTAAGGATTTCAACTACTCAGATCCTGTAAATGACAACGATAATTCTGTAC
 CTTTCGATTCCACAAAATAAAGTATCACCACACCAGTCAAAGCATTTCATGATTACTCAAACATTTGG
 GTCATTCCAGAACGCTTTTCTAGTGACACAATCCGAGTTTATCTAAACCTCCGCGTCCGACGTCACAAA
 TATCAGAGCTATTACGATCCCTCATATCTCAGTACGGACGAACAAAAGATACTTTCTTAAAGGTATC
 ATTAACCTGTTTAAAGCGTATTAATGAGCGGATATCGGGAAAAAGTTGATTAATTATCTTGTGGGT
 TCCCCGTTTCATGGGCGATAGCTCTACCCCCGAAGACACTTTTGATTTTACCCGTCATACGACAAACATC
 GCGGTAGAGAAGTTTGGAGAACGGATCGTGGAAAGTCAAAACATCATTACACCTAGCGTCTTAATTTTT
 GGTCCGCTGCCAACATCTTAGATTATACAGCCAGCCTGACTTTGCAGGGGCAACAGTCAATCCGAGT
 TTCGAAGGTTTTGGTACCCTGAGCATTCTGAAAGTTGCCCGGAATTTCTGCTCACTTTTCAGATGTC
 ACCAGCAACCAGAGCTCAGCAGTATTAGGAAAGTCAATTTTTTGCATGGACCCGTTTATGCACTGATG
 CACGAACGACGCACTCTCTGCATCAACTGTATGGGATCAACATCCCCAGTGACAAACGATTTCCGTC
 CAGGTGCTGAAGGATTTTTCTCACAGGATGGGCCGAACGTCAGTTCGAAGAGTTGTATACTTTCCGGA
 GGCCTGGACGTAGAGATCATTCCCAGATTGAGCGCAGTCACTGCGTGAGAAGGCATTGGGCCATTAT
 AAGGATATTGCAAAACGCTGAATAACATTAACAAAACGATTCATCTTCGTTGGATCTCGAATATTGAT
 AAATATAAGAAAAATTTTAGCGAGAAATAAATTTTGGATAAAGATAATACAGGTAACCTTTGTGGTTAAC
 ATTGACAAATTTCAACTCCCTTTACAGTGAATTTGACGAATGTAAATGAGCGAAGTTGTGTATAGTTCCCAA
 TACAACGTTAAGAAATCGTACCATTACTTCTCTCGTCACTACCTGCCGGTTTTCCGGAACATCCTTGAC
 GATAATATTTACACTATTCTGTCAGCGCTTAACTTGACCAACAAGGGCTTCAATATTGAAAAATTCAGGC
 CAGAACATTGAACGCAACCCGGCCTTGCAAACTGTGAGTGAATCCGTGGTTGACCTGTTTACCAA
 GTCTGCCGTCGACAAAAGCGAAGAGAAGCTGTACGATGACGATGACAAAAGATCGTTGGGGATCGTCCCTG
 CAGTGTATTAAGTGA AAAACAATCGGCTGCCTTATGTAGCAGATAAAGATAGCATTAGTCAGGAGATT
 TTCGAAAATAAAATTTATCAGTACGAAACCAATGTTGAGAATTTATTCAGATAAATTTTCACTGGACGAA
 AGCATCTTAGATGGCAAGTTCGGATTAACCCGGAATTTGTGATCCGTTACTGCCGAACGTTGAATATG
 GAACCGTTAAACCTCCCTGGCGAAGAGATCGTATTTATGATGACATTACGAAATATGTGGACTACCTT
 AATCTTATTACTATTGGAAAGCCAGAACTGTCCAATAACGTTGAAAACATTACTTGACCAACAGC
 GTGGAAGAGGCTTTAGGCTACTCAAATAAGATTTTACCTTCTCCCGTCCGCTGGCGGAAAAAGTAAAT
 AAAGTGTGAGGCTGGTCTGCTTCACTGGGCGAATGAAGTTGTGCAAGACTTTACCACGAATATT
 ATGAAAAAGGATACCCTGGATAAAATCTCCGACGCTCGGTTATTATCCCATATAATTGGCCCTGCGTTA
 AATATCGGTAATAGTGCCTGCGGGGGAATTTTAAACAGGCTTTGCTACCGCGGGGCTGCGCTTCTC
 CTGGAGGCTTTCTGAATTTACTATCCCGCGCTCGGTTTTCATTTTACTCTTCCATCCAGGAG
 CGTGAGAAAATTTCAAACCATCGAAAACGCTGGAGCAGCGGTGAAACGCTGGAAAGATTCTTAT
 CAATGGATGGTGTCAAACCTGTTTATCTCGCATCAGACCCAAATCAACCATATTAATTACCAGATGTAT
 GATAGTCTGTGCTACCAAGCTGACGCCATTAAGCCAAAATGATCTGGAATATAAAAAAGTACTCTGGT
 AGCGATAAGGAGAACATCAAAGCCAGGTGGAGAACCCTTAAGAATAGTCTGGATGTGAAAATCTCTGAA
 GCTATGAATAACATTAACAAATTCATTCGTGAATGTTGCGGTGACGTACCTGTTCAAGAATATGCTGCCA
 AAAGTTATTGATGAACTGAATAAATTTGATCTGCGTACCAAAACCGAATTTCAACCTCATCGACTCC
 CACAACATTACTCTGTGGCGAAGTGGATCGTCTGAAGGCCAAAAGTAAACGAGAGCTTTGAAAATACG
 ATGCCGTTAATATTTTTTCATATACCAATAACTCCTTGCTGAAAGATATCATCAATGAATATTTCAAT
 taataagctt

5. Secuencia de ADN del ligando humano CP-EN-GS15-SST28

CATATGGGATCCGTTTAAACGTCGACGGCATCATTACCTCCAAAACATAAATCTGACGATGACGATAAA
 AGCGCAATTCAAATCCTGCAATGGCGCCACGCGAACGCAAGCTGGTTGCAAAAACCTTCTTCTGGAAA
 ACCTTCACTCTTGGCGCTAGCGGGCGGTGGCGGTAGCGCGGTGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGTAGC
 GCACTAGTGCTGCAAGCTAGATAATGAAAGCTT

6. Secuencia de ADN de CT-GS20-CST28 humano

GGATCCGTCGACCTGCAGGGTCTAGAAGGCGGTGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGT
 AGCGGCGGTGGCGGTAGCGCACTAGTGCAGGAAAGACCTCCATTACAACAACCTCCACATCGCGATAAG
 AAACCATGTAAGAAATTTCTTTGGAAAACATTTAGCAGTTGCAAATGATAAAAAGCTT

5

7. Secuencia de proteína de la fusión CP-CST14-GS20-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRIPQNKLIITPVKAFMITQNIWVPERFSSDTPNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD I GKLI INYL VVGS PFMGDSSTPEDTDFTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGELPN I LDYASLTLQGQSNPSFEFGFTLS I LKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFPSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEI I PQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNNINKTIPSSWISNIDKYKKI PSEKYNFDKNTGNFVFNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFAN I LDDNI YTI RDGFNLTKGFNI ENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKPKNFFWKTFSCKALAGGGGSGGGGSGGGG
 SALVLQCIKVKNNRLLPYVADKDSISQEI FENKI I TDETNVQNYSDKFLDES I LDGQVPINPEI VDLL

 PNVNMEPLNLPGEI I VFYDDI TKYVDYLN SYYLESQKLSNNVENITLTTSV EALGYSNKI YTFPLPSL
 AEKVNKGVAQGLFLNWANEVVEDFTTNIMKDDTLDKI SDVSVI I PY IGPALN I GNSALRGNFNQAFATA
 GVAFLLEGFPFEFTI PALGVFTFYSSIQEREKI I KTIENCLEQRVKRWKDSYQWVSNWLSRIITTFQFNHI
 NYQMYDSLSYQADAI KAKIDLEYKYSKSDKENI KSVENLKNLSDVKI SEAMNNINKF I RECSVTYLF
 KNMLPKVIDELNKFDRKTELINL I DSHNI I LVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNIFSYTNNSLLDKI I
 NEYFN

8. Secuencia de proteína de la fusión CP-CST14-GS30-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD I GKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGPLPNILDY TASLTLQGQQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTI RDGFNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTSDDDDKPCKNFFWKT FSSCKALAGGGGSGGGGSGGGG
 SGGGGSGGGGSALALQCI KVKNNRLLPYVADKDS ISQEI FENKI ITDET NVQNYSDKFSLDES ILDGQVP
 INPEI VDP LLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDI TKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTSVEEALGYS
 NKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTL DKISDVSVI IPYIGPALNIGNSALR
 GNFNQAFATAGVAFLEGGPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTI ENCLEQRV KRWKDSYQWMVSNWL
 SRITTFQFNHINYQMYDSLSYQADAI KAKIDLEYK KYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMNNINKF
 IRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKF DLRTKTELINLIDSHNI I LVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI FSY
 TNNSLLKDI INEYFN

9. Secuencia de proteína de la fusión CP-CST28-GS20-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD I GKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGPLPNILDY TASLTLQGQQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTI RDGFNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTSDDDDKQER PPLQPPHRDKKPKNFFWKT FSSCKAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALVLQCI KVKNNRLLPYVADKDS ISQEI FENKI ITDET NVQNYSDKFSLDES IL
 DGQVP INPEI VDP LLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDI TKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTSVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTL DKISDVSVI IPYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGGPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTI ENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRITTFQFNHINYQMYDSLSYQADAI KAKIDLEYK KYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKF IRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKF DLRTKTELINLIDSHNI I LVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

10. Secuencia de proteína de la fusión CP-CST28-GS30-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD I GKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGPLPNILDY TASLTLQGQQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTI RDGFNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTSDDDDKQER PPLQPPHRDKKPKNFFWKT FSSCKAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALVLQCI KVKNNRLLPYVADKDS ISQEI FENKI I TDET NVQNYSDKFSLDES
 DKFSLDES ILDGQVP INPEI VDP LLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDI TKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVE
 NITLTSVEEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTL DKISDVSVI I
 PYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGGPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTI ENCLEQRV
 KRWKDSYQWMVSNWLSRITTFQFNHINYQMYDSLSYQADAI KAKIDLEYK KYSGSDKENI KSQVENLKN
 SDVKI SEAMNNINKF IRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKF DLRTKTELINLIDSHNI I LVGEVDRLKAKV
 NESFENTMPFNI FSYTNNSLLKDI INEYFN

5

11. Secuencia de proteína de la fusión CP-SST14-GS20-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD I GKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGPLPNILDY TASLTLQGQQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTI RDGFNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTSDDDDKAGCKNFFWKTFTSCALAGGGGSGGGGSGGGG
 SALVLQCI KVKNNRLLPYVADKDS ISQEI FENKI I TDET NVQNYSDKFSLDES ILDGQVP INPEI VDP
 LLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDI TKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTSVEEALGYSNKIYTFPLSL
 AEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTL DKISDVSVI IPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATA
 GVAFLLEGGPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTI ENCLEQRV KRWKDSYQWMVSNWLSRITTFQFNH
 NYQMYDSLSYQADAI KAKIDLEYK KYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMNNINKF IRECSVTYLF
 KNMLPKVIDELNKF DLRTKTELINLIDSHNI I LVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI FSYTNNSLLKDI I
 NEYFN

12. Secuencia de proteína de la fusión CP-SST14-GS30-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD IGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKVNTNI I TSPVLI FGLPNILDYASLT LQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGNVQFEELYTFGGLD
 VEI I PQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTI RDGFNLTNKGFNIE NSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKAGCKNFFWKTF TSCALAGGGGSGGGGSGGGG
 SGGGSGGGGSSALALQCI KVKNNR L PYVADKDS ISQEIFENKI I TDETNVQNYSDKFSLDES ILDGQVP
 INPE IVDPLLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYLESQKLSNNVENI TLTT SVEEALGYS
 NKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVI I PYIGPALNIGNSALR
 GNFNQAFATAGVAFLLEGFP EFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTI ENCLEQRV KRKDSYQWMVSNWL
 SRITTFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYK KYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMNNINKF
 IRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI FSY
 TNNSLLKDI INEYFN

13. Secuencia de proteína de la fusión CP-SST28-GS20-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD IGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKVNTNI I TSPVLI FGLPNILDYASLT LQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGNVQFEELYTFGGLD
 VEI I PQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTI RDGFNLTNKGFNIE NSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKSANSNPAMAPRERKAGCKNFFWKTF TSCALA
 GGGGSGGGGSGGGGSSALVLCI KVKNNR L PYVADKDS ISQEIFENKI I TDETNVQNYSDKFSLDES ILD
 GQVP INPE IVDPLLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYLESQKLSNNVENI TLTT SVEEA
 LGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVI I PYIGPALNIGN
 SALRGNFNQAFATAGVAFLLEGFP EFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTI ENCLEQRV KRKDSYQWMV
 SNWLSRITTFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYK KYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMNN
 INKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI
 FSYTNNSLLKDI INEYFN

14. Secuencia de proteína de la fusión CP-SST28-GS30-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD IGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKVNTNI I TSPVLI FGLPNILDYASLT LQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGNVQFEELYTFGGLD
 VEI I PQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTI RDGFNLTNKGFNIE NSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKSANSNPAMAPRERKAGCKNFFWKTF TSCALA
 GGGGSGGGGSGGGGSSALALQCI KVKNNR L PYVADKDS ISQEIFENKI I TDETNVQNYSD
 KFSLDES ILDGQVP INPE IVDPLLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYLESQKLSNNVEN
 ITLTT SVEEALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVI I P
 YIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLLEGFP EFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTI ENCLEQRV
 RKKDSYQWMVSNWLSRITTFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYK KYSGSDKENI KSQVENLKNSL
 DVKI SEAMNNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVN
 ESFENTMPFNI FSYTNNSLLKDI INEYFN

5

15. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST14-GS20-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD IGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKVNTNI I TSPVLI FGLPNILDYASLT LQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGNVQFEELYTFGGLD
 VEI I PQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTI RDGFNLTNKGFNIE NSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEEKLYDDDDKDRWGSSLQCI KVKNNR L PYVADKDS ISQEIFEN
 KI I TDETNVQNYSDKFSLDES ILDGQVP INPE IVDPLLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN S
 YLESQKLSNNVENI TLTT SVEEALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKK
 DTLDKISDVSVI I PYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLLEGFP EFTI PALGVFTFYSSI QEREK
 I I KTI ENCLEQRV KRKDSYQWMVSNWLSRITTFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYK KYSGSDK
 ENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMNNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI
 ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI FSYTNNSLLKDI INEYFNLEGGGSGGGGSGGGGSSALVPCKNFF
 WKTFSSCK

16. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST14-GS30-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLIITPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNPSLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKR INERDIGKKL INYL VVGS PFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNIAVE
 KFENGSKVVTNI ITPSVL I FGPLPNILDY TASLTLQGGQSNPS FEGFGTLSILKV APEFLLTFS DVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKR IRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEI I PQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN INKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDNITGNFVVIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIY TIR DGFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEEKLYDDDDKDRWGSSLQCIKVKNR LPYVADKDSISQEIFEN
 KIITDET NVQNYSDKFLDES ILDGQVPINPEI VDP LPLPNVNM EPLNL PGEIIVFYDDITKYVDYLSY
 YYLESQKLSNNVENITLTSVEEALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKK
 DTLDKISDVSVI I PYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIPALGVFTFYSSI QEREK
 I IKTI ENCLEQRV KRW KDSYQWMVSNWLSRITTFQFNHINYQMYDSLSYQADAIKAKIDLEYK KYSGSDK
 ENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI
 ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI FSYTNNSLLKDI INEYFNLEGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 SALVPCKNFFWKTFSSCK

17. Secuencia de ADN de la fusión CT-CST28-GS20-LHD

GGATCCATGACGTGGCCAGTTAAGGATTTCAACTACTCAGATCCTGTAATGACAACGATATTCTGTAC
 CTTTCGCAATCCACAAAATAAACTGATCACCACACCAGTCAAAGCATTATGATTA CTAACAAA CATTGG
 GTCATCCAGAACGCTTTTCTAGTGACACAAAATCCGAGTTTATCTAAACCTCCGCGTCCGACGTCCAAA
 TATCAGAGCTATTACGATCCCTCATATCTCAGTACGGACGAACAAAAGATACTTTCCCTAAAGGTATC
 ATTAACCTGTTTAAAGCGTATTAATGAGCGCGATATCGGGAAAAGTTGATTAATATCTGTGTGGGT
 TCCCCGTTTCATGGCGGATAGCTCTACCCCCGAAGACACTTTTGATTTTACCCTGCATACGACAAACATC
 GCGGTAGAGAAGTTTGAGAACCGGATCGTGGAAAAGTCAAAACATCATTACACCTAGCGTCTTAATTTT
 GGTCCGCTGCCAACATCTTAGATTATACAGCCAGCCTGACTTTGCAGGGGCAACAGTCGAATCCGAGT
 TTCGAAGGTTTTGGTACCCTGAGCATCTGAAAGTTGCCCGGAATTTCTGCTCACTTTTTCAGATGTC
 ACCAGCAACCAGAGCTCAGCAGTATTAGGAAAAGTCAATTTTTGCATGGACCCCGTTATTGCACTGATG
 CACGAACTGACGCACTCTCTGCATCAACTGTATGGGATCAACATCCCCAGTGACAAACGATTTCCGTC
 CAGGTGTCTGAAGGATTTTTCTCACAGGATGGGCCGAACGTCAGTTTCGAAGAGTTGTATACTTTCCGA
 GGCCTGGACGTAGAGATCATTTCCCAGATTGAGCGCAGTCAGCTGCGTGAGAAGGCATTGGGCCATTAT
 AAGGATATTGCAAAACGCTGAATAACATTAACAAAACGATTCCATCTTCGTTGGATCTCGAATATTGAT
 AAATATAAGAAAATTTTTAGCGAGAAATATAATTTTGATAAAGATAATACAGGTAACCTTTGTGGTTAAC
 ATTGACAAATTCACCTCCCTTTACAGTGAATTTGACGAATGTAATGAGCGAAGTTGTGTATAGTTCCCAA
 TACAACGTTAAGAACTCGTACCATTACTTCTCTCGTCACTACCTGCCGGTTTTTCGCGAACATCTTGAC
 GATAATATTACACTATTCTGTGACGGCTTTAACTTGACCAACAAGGGCTTCAATATTGAAAATTCAGGC
 CAGAACATTGAACGCAACCCGGCCTTGCAGAACTGTCGAGTGAATCCGTTGGTTGACCTGTTTACAAA
 GTCGTCGCTCGACAAAAGCGAAAGAGAAGCTGTACGATGACGATGACAAAGATCGTTGGGGATCGTCCCTG
 CAGTGTATTAAGATGAAAACAATCGGCTGCCCTTATGTAGCAGATAAAGATAGCATTAGTCAGGAGATT
 TTCGAAAATAAAATGATCACTGACGAAACCAATGTTTTCAGAAATATTTCAGATAAAATTTTCACTGGACGAA
 AGCATCTTAGATGGCCAAGTTCGGATTAACCCGAAATGTTGATCCGTTACTGCCGAACTGAAATATG
 GAACCGTTAAACCTCCCTGGCGAAGAGATCGTATTTTATGATGACATTACGAAATATGTGGACTACCTT
 AATCTTATTACTATTTGGAAAGCCAGAACTGTCCAATAACGTGGAAAACATTACTCTGACCACAAGC
 GTGGAAGAGGCTTTAGGCTACTCAAATAAGATTTTATACCTTCCCTCCGTCGCTGGCGGAAAAGTAAAT
 AAAGGTGTGCAGGCTGGTCTGTTCTCAACTGGGCGAATGAAGTTGTGCAAGACTTTACCACGAATATT
 ATGAAAAGGATACCTGGATAAAATCTCCGACGCTCGGTTATATCCCATATATTGGCCCTGCGTTA
 AATATCGGTAATAGTGCCTGCGGGGAATTTTAAACAGGCCTTTGCTACCGCGGGCGTTCGCGTTCTC
 CTGGAGGGCTTTCTGAAATTTACTATCCCGCGCTCGGTGTTTTTACATTTTACTCTTCCATCCAGGAG

CCTGAGAAAATTATCAAACCATCGAAAACCTGCCTGGAGCAGCGGGTGAAACGCTGGAAAGATTCTTAT
 CAATGGATGGTGTCAAACCTGGTTATCTCGCATCACGACCAATCAACCATATTAATTACCAGATGTAT
 GATAGTCTGTGTCACCAAGCTGACGCCATTAAGCCAAAATGATCTGGAATAAAAAAGTACTCTGGT
 AGCGATAAGGAGAACATCAAAGCCAGGTGGAGAACCTTAAGAATAGTCTGGATGTGAAAATCTCTGAA
 GCTATGAATAACATTAACAAATTCATTCTGGAATGTTCCGGTACGCTACCTGTTCAAGAATATGCTGCCA
 AAAGTTATTGATGAACTGAATAAATTTGATCTGCGTACCAAACCGAATTTCAACCTCATCGACTCC
 CACAACTATTCTTGTGGCGAAGTGGATCGTCTGAAGGCCAAAGTAAACGAGAGCTTTGAAAATACG
 ATGCCGTTAATATTTTTTATATACCAATAACTCCTTGCTGAAAGATATCATCAATGAATATTTCAAT
 CTAGAAGGCGGTGGCGGTAGCGCGGTGGCGGTAGCGCAGTACGCACTAGTGCAGGAAAAGA
 CCTCCATTACAACAACTCCCATCGCGATAAGAAAACCATGTAAGAATTTCTTTTGGAAAACATTTTAGC
 AGTTGCAAAataaagctt

5 18. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST28-GS20-LHD

TWPVKDFNYSDFVNDNDILYLRIPQNKLIITPVKAFMITQNIWVPERFSSDTPNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERDIGKKLINYLTVVGSPPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKVVTNIITPSVLIIFGPLPNILDYASLTLQGGQSNPSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKNTGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDFGNLTNKGFNIEENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEKLYDDDDKDRWGSSLQCIKVKNNRPLPYVADKDSISQEIFEN
 KIITDETQVQNSDKFSLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEIIVFYDDITKYVDYLSY
 YLESQKLSNNVENITLTTSVVEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKGVOAGLFLNWANEVVEDEFTTNIMKK
 DTLDKISDVSVIIPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREK
 IKTIENCLEQRVWRKDSYQWVSNWLSRITTFQFNHINYQMYDLSYQADAIKAKIDLEYKKSYSKSDK
 ENIKSQVENLNKSLDVKISEAMNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI
 ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI FSYTNNLSLLKDI INEYFNLEGGGGSGGGSGGGGSALVQERPP
 QPPHRDKKPKCNFFWKTFSCK

19. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST28-GS30-LHD

TWPVKDFNYSDFVNDNDILYLRIPQNKLIITPVKAFMITQNIWVPERFSSDTPNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERDIGKKLINYLTVVGSPPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKVVTNIITPSVLIIFGPLPNILDYASLTLQGGQSNPSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKNTGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDFGNLTNKGFNIEENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEKLYDDDDKDRWGSSLQCIKVKNNRPLPYVADKDSISQEIFEN
 KIITDETQVQNSDKFSLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEIIVFYDDITKYVDYLSY
 YLESQKLSNNVENITLTTSVVEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKGVOAGLFLNWANEVVEDEFTTNIMKK
 DTLDKISDVSVIIPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREK
 IKTIENCLEQRVWRKDSYQWVSNWLSRITTFQFNHINYQMYDLSYQADAIKAKIDLEYKKSYSKSDK
 ENIKSQVENLNKSLDVKISEAMNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI
 ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI FSYTNNLSLLKDI INEYFNLEGGGGSGGGSGGGGSALVQERPP
 LQPPHRDKKPKCNFFWKTFSCK

20. Secuencia de proteína de la fusión CT-SST14-GS15-L(#Fxa)HD

TWPVKDFNYSDFVNDNDILYLRIPQNKLIITPVKAFMITQNIWVPERFSSDTPNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERDIGKKLINYLTVVGSPPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKVVTNIITPSVLIIFGPLPNILDYASLTLQGGQSNPSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGRNVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKNTGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDFGNLTNKGFNIEENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEKLYIDGRWGSSLQCIKVKNNRPLPYVADKDSISQEIFENKII
 TDETQVQNSDKFSLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEIIVFYDDITKYVDYLSY
 ESQKLSNNVENITLTTSVVEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKGVOAGLFLNWANEVVEDEFTTNIMKK
 DTLDKISDVSVIIPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREK
 IKTIENCLEQRVWRKDSYQWVSNWLSRITTFQFNHINYQMYDLSYQADAIKAKIDLEYKKSYSKSDK
 ENIKSQVENLNKSLDVKISEAMNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI
 ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI FSYTNNLSLLKDI INEYFNLEGGGGSGGGSGGGGSALVAGCKNFFW
 KFTSC

5

21. Secuencia de proteína de la fusión CT-SST14-GS30-LHD

TWPVKDFNYSDFVNDNDILYLRIPQNKLIITPVKAFMITQNIWVPERFSSDTPNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERDIGKKLINYLTVVGSPPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKVVTNIITPSVLIIFGPLPNILDYASLTLQGGQSNPSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKNTGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDFGNLTNKGFNIEENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEKLYDDDDKDRWGSSLQCIKVKNNRPLPYVADKDSISQEIFEN
 KIITDETQVQNSDKFSLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEIIVFYDDITKYVDYLSY
 YLESQKLSNNVENITLTTSVVEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKGVOAGLFLNWANEVVEDEFTTNIMKK
 DTLDKISDVSVIIPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREK
 IKTIENCLEQRVWRKDSYQWVSNWLSRITTFQFNHINYQMYDLSYQADAIKAKIDLEYKKSYSKSDK
 ENIKSQVENLNKSLDVKISEAMNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI
 ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI FSYTNNLSLLKDI INEYFNLEGGGGSGGGSGGGGSALVAGCKNFFW
 KFTSC

22. Secuencia de proteína de la fusión CT-SST28-GS20-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRIQNKLIITPVKAFMITQNIWVI PERFSSTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKLINYLVVGSPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKWVTNI I TPSVLI FGPLPNILDYASLTLQGQQSNPSFEGFGTSLILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDPVIALMHETHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEI I PQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINNKTI PPSWISNIDKYKFI FSEKYNFDKDN TGNFVVNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTI RDGFNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEKLYDDDDKDRWGSSSLQCI KVKNNRLLPYVADKDSISQEI FEN
 KIITDETNVQNYSDKFSLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEIIVFYDDITKYVDYLSY
 YYLESQKLSNNVENITLTTSEVEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKGVQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKK
 DTLDKISDVSVI I PYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREK
 I I KTIENCLEQRVKRWKDSYQWMVSNWLSRITTFQFNHINYQMYDSL SYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDK
 ENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNIN KFI RECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDRNTKTELINLIDSHNI
 ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI FSYTNNLLKDI INEYFNLEGGGGSGGGSGGGGSALVSANSNP
 AMAPRERKAGCKNFFWKFTFTSC

23. Secuencia de proteína de la fusión CT-SST28-GS30-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRIQNKLIITPVKAFMITQNIWVI PERFSSTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKLINYLVVGSPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKWVTNI I TPSVLI FGPLPNILDYASLTLQGQQSNPSFEGFGTSLILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDPVIALMHETHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEI I PQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINNKTI PPSWISNIDKYKFI FSEKYNFDKDN TGNFVVNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTI RDGFNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEKLYDDDDKDRWGSSSLQCI KVKNNRLLPYVADKDSISQEI FEN
 KIITDETNVQNYSDKFSLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEIIVFYDDITKYVDYLSY
 YYLESQKLSNNVENITLTTSEVEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKGVQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKK
 DTLDKISDVSVI I PYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREK
 I I KTIENCLEQRVKRWKDSYQWMVSNWLSRITTFQFNHINYQMYDSL SYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDK
 ENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNIN KFI RECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDRNTKTELINLIDSHNI
 ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI FSYTNNLLKDI INEYFNLEGGGGSGGGSGGGGSALVSANSNP
 AMAPRERKAGCKNFFWKFTFTSC

24. Secuencia de proteína de la fusión CT-SST14-GS35-LHC

PITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVI PDRFSRNSNPNLNKPFRVTS PKSG
 YYDPNYLSTDSKDTFLKEI I KLFKRINSREIGEELIYRLSTDI PFPGNNTPI NTDFDVFNSVDVK
 TRQGNWVKTGSI NPSV I I TGPRENI IDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALS I I S I SPRFMLTYSNATND
 VGEGRFSKSEFCMDPILILMHETHAMHNLGYIAI PNDQTI SSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPT
 IDLIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSITANPSSFNKYIGEYKQKLI RKYRFVVESSGEVTVNRNK
 FVELYNELTQIFTEFNYAKI YNVQNRKI YLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNI PKSNLNVLFMGQNL
 SRNPALRKVNPENMLYLFTKFCVDAIDGRSLYNKTLQCRELLVKNLTDLPF IGDI SDVKTDI FLRKDINE
 ETEVIYYPDNVSDQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFFYDNRTQNVYDYLNSYYYLESQ
 KLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGFLMWANDVVEDFTTNILRKDTLDKI
 SDVSAI I PYIGPALNINSVRRGNFTEAFVGTGVTILLEAFPEFTI PALGAFVIYSKVQERNEI I KTI
 NCLEQRI KRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNINSYQMYDSLNYQAGAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQ
 VENLKNSLDVKISEAMNIN KFI RECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDRNTKAKLINLIDSHNI ILVGEV

5

DKL KAKVNNSFQNTI PFNI FSYTNNLLKDI INEYFNLEGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
 GGGGSALVAGCKNFFWKFTFTSC

25. Secuencia de ADN de la fusión CP-SST28-GS15-LHA

ggatccATGGAGTTCGTTAACAAACAGTTCAACTATAAAGACCCAGTTAACGGTGTGACATTGCTTAC
 ATCAAAATCCCGAACGCTGGCCAGATGCAGCCGGTAAAGGCATTCAAATCCACAACAAAATCTGGGTT
 ATCCCGGAACGTGATACCTTTACTAACCCGGAAGAAGGTGACCTGAACCCGCCACCGGAAGCGAAACAG
 GTGCCGGTATCTACTATGACTCCACCTACCTGTCTACCGATAACGAAAAGGACAACCTACCTGAAAGGT
 GTTACTAAACTGTTCCGAGCGTATTTACTCCACCGACCTGGGCGGTATGCTGCTGACTAGCATCGTTCCG
 GGTATCCCGTCTGGGGCGGTTCTACCATCGATACCGAACTGAAAGTAATCGACACTAACTGCATCAAC
 GTTATTCAGCCGACGGTTCCTATCGTTCCGAAGAAGTGAACCTGGTGATCATCGGCCCGTCTGCTGAT
 ATCATCCAGTTCGAGTGTCTGAGCTTTGGTACGAAGTCTGAACCTCACCCGTAACGGCTACGGTTC
 ACTCAGTACATCCGTTTCTCTCCGACTTACCTTCGGTTTTGAAGAATCCCTGGAAGTAGACACGAAC
 CCACTGCTGGGCGCTGGTAAATTCGCAACTGATCCTGCGGTTACCCTGGCTCACGAACGATTTCATGCA
 GGCCACCGCTGTACGGTATCGCCATCAATCCGAACCGTGTCTTCAAAGTTAACACCAACCGGTATTAC
 GAGATGTCGGTCTGGAAGTTAGCTTCGAAGAAGTGGTACTTTTGGCGGTACGACGCTAAATTCATC
 GACTCTCTGCAAGAAAACGAGTTCGGTCTGTACTACTATAACAAGTTCAAAGATATCGCATCCACCCCTG
 AACAAAGCGAAATCCATCGTGGGTACCCTGCTTCTCTCCAGTACATGAAGAACGTTTTTAAAGAAAA
 TACCTGCTCAGCGAAGACACCTCCGGCAAATTCCTCTGAGACAAGTTGAAATTCGATAAACTTTACAAA
 ATGCTGACTGAAATTTACACCGAAGACAACCTCGTTAAGTTCCTTAAAGTTCGAACCGCAAAACCTAT
 CTGAACCTCGACAAGCGAGTATTCAAAATCAACATCGTCCGAAAGTTAATACACTACTACGATGGT
 TTCAACCTGCGTAAACCAACCTGGCTGCTAATTTTAAACGGCCAGAACACGGAAATCAACAACATGAAC
 TTCACAAAACCTGAAAACTTCACTGGTCTGTTTCGAGTTTTACAAGCTGCTGCGTCCGACGATCATT
 ACCTCCAAAACATAATCTGACGATGACGATAAAAAGCGCAATTCAAATCCTGCAATGGCGCCACGGGAA
 CGCAAAGCTGGATGCAAAAACCTCTTTTGAAGACATTTACTAGTTGTGCGCTAGCGGGCGGTGGCGGT
 AGCGGCGGTGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGTAGCGCACTAGTGTGCAGTGTATCAAGTTAAACAACCTGG
 GATTTATTTCTCAGCCGAGTGAAGACAACCTCACCAACGACCTGAACAAAGGTGAAGAAATCACCTCA
 GATACTAACATCGAAGCAGCGAAGAAAAACATCTCGTGGACCTGATCCAGCAGTACTACCTGACCTTT
 AATTTCCGAAACGAGCCGGAACATTTCTATCGAAAACTGAGCTCTGATATCATCGGCCAGCTGGAA
 CTGATGCCGAACATCGAACGTTTCCCAAACGGTAAAAAGTACGAGCTGGACAAATATACCATGTTCCAC
 TACCTGCGCGCGCAGGAATTTGAACACGGCAAATCCCGTATCGCACTGACTAACTCCGTTAACGAAGCT
 CTGCTCAACCCGTCCTGTTATACACCTTCTCTAGCGACTACGTGAAAAAGGTCAACAAAGCGACT
 GAAGCTGCAATGTTCTTGGGTTGGGTTGAACAGCTTGTATTATGATTTTACCGACGAGCGTCCGAAGTA
 TCTACTACCGACAAAATTGGCGGATATCACTATCATCCCGTACATCGGTCCGCTGTAACATTTGGC
 AACATGCTGTACAAAGACGACTTCGTTGGCGCACTGATCTTCTCCGGTGGCGGTGATCCTGCTGGAGTTC
 ATCCCGGAAATCGCCATCCCGGTACTGGGCACCTTTGCTCTGTTTCTTACATTGCAAAACAAGTTCTG
 ACTGTACAAACCATCGACAACCGCGTGAAGCAACGTAACGAAAAATGGGATGAAGTTACAAATATATC
 GTGACCAACTGGCTGGCTAAGGTTAATACTCAGATCGACCTCATCCGCAAAAAATGAAAGAAGCACTG
 GAAAACCGGCGGAAGCTACCAAGGCAATCATTAACTACCAAGTACAACCAAGTACACCGGAGGAAGAAAA
 AACACATCAACTTCAACATCGACGATCTGTCTCTAACTGAACGAATCCATCAACAAGCTATGATC
 AACATCAACAAGTTCCTGAACAGTGTCTGTAAGCTATCTGATGAACTCCATGATCCCGTACGGTGT
 AAACGCTGGAGGACTTCGATGCGTCTCTGAAAGACGCCCTGCTGAAATACATTTACGACAACCGTGGC
 ACTCTGATCGGTGAGTGTCTGTAAGGACAAGTGAACAATACTTACGACCGACATCCCTTTT
 CAGCTCAGTAAATATGTCGATAACCAACGCCTTTTGTCCACTtaataagctt

26. Secuencia de proteína de la fusión CP-SST28-GS15-LHA

EFVKNQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWIVIPERDFTNPEEGDLNPPPEAKQVPV
 SYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGI PFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQ
 PDGSYRSEELNLVIGPSADI IQFECLSFGEVLNLRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL
 GAGKFATDPAVTLAHEL IHAGHRLYGIA INPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFI DSI
 QENEFRLYYNKF KD IASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSKFSVDKLFKDKLYKMLT
 EIYTEDNFVKFKVLNLRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNT E INNMNFTK
 LKNFTGLFEFYKLLCVDGI I TSKTKSDDDDKSANSNPAMAPRERKAGCKNFFWKTFTSCALAGGGGSGG
 GSGGGGSALVLQCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEI TSDTNI EAAEENI SLDLIQQYYLTFNFD
 NEPENIS IENLSSDI IQLELMPNIERFPNGKKEYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIAL TNSVNEALLN
 PSRVYTFSSDYKVKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFDETSEVSTDKIADITIIIPYIGPALNIGNML
 YKDDFVGALIFSGAVILLEFIP EIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSKRNEKWDEVYKYIVTN
 WLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAI INYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININ
 KFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRDKDKVNNLSTDI PFQLS
 KYVDNQRLST

27. Secuencia de proteína de la fusión CT-SST28-GS15-LHB

PVTINNPNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGGRYKAFKIIDRIWIIPERYTFGYKPEDFNKSSGIFNRDV
 CEYYDPDYLTNDKKNIFLQTMIKLFNRKISKPLGKLEMIINGIPYLGDRRVPLEEFNTNIASVTVN
 KLISNPGEVERKKGIFANLIIPGPGPVLNENETIDIGIQNHFASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQE
 NKGASIFNRRGYFSDPALILMHელიHVLHGLYGIKVDDLPVINEKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDP
 SIITPSTDKSIYDKVLQNFIRGIVDRLNKVLVCISDPNINININIKNFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFD
 KLYKSLMFGFTETNIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEEFGNISDKMEKEYRGQNK
 INKQAYEESISKEHLAVYKIQMCVDGIITSKTKSDDDDKKNALNLQCIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLK
 NERIEYNTQSNYIENDFPINELILDTDLISKIELPSENTESLTFNVDVVPVEKQPAIKKIFTDENTIF
 QYLYSQTFFLDIRDISLTSPPDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVNDFVIEANK
 SNTMDKIADISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLSEYIDNKN
 KIKTIDNALTKRNEKWSMDYGLIVAQWLSVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEEIKYRYNIYSEKE
 KSNINIDFNDINSKLNENINQADININNFINGCSVSYLMKMIPLAVEKLLDFDNTLKNLLNYIDENK
 LYLIGSAEYKSKVNYKYLKTIIMPFDLSIYTNDTILIEFMFNKYNLEGGGGGGGGGGGGGGGSSALDSANSN
 PAMAPRERKAGCKNFFWKTFTSC

28. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST14-GS20-LHC

PITINNPNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNPNLNKPFRVTSKPSG
 YYDPNYLSTDSKDTFLKEIKLFRKINSREIGEELIYRLSTDI PFPGNNTPIINTFDVDVDFNSVDVK
 TRQGNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSIISSIPRFMLTYSNATND
 VGEGRFSKSEFCMDPILILMHელიNHAMHNLGYIAIPNDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPT
 IDLIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKLI RKYRFVVESSGEVTVNRNK
 FVELYNELTQIFTEFNKYIYVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNI PKSNLNLVFMGQNL
 SRNPALRKVNPNENMLYLFTKFCVDAIDGRSLYKNTLQCRELLVKNTDL PFI GDISDVKTDIFLRKDI
 ETEVIYYPDNVSDQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFDNRNTQNVYDLSNYYYLESQ
 KLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGFLMWANDVVEDFTTNILRKTDLDKI
 SDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEAFVAVTGVTTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIKITID
 NCLEQRIKRKWDSEYEMMGWLSRIITQFNISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKYSKSDKENIKSQ
 VENLKNSLDVKISEAMNINIKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNII LVGEV
 DKLKAKVNNSFQNTIPFNIFSYTNNLLKDIINEYFNLEGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSSALVAGCKNFF
 WKTFTSC

29. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST17-GS25-LHC

PITINNPNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNPNLNKPFRVTSKPSG
 YYDPNYLSTDSKDTFLKEIKLFRKINSREIGEELIYRLSTDI PFPGNNTPIINTFDVDVDFNSVDVK
 TRQGNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSIISSIPRFMLTYSNATND
 VGEGRFSKSEFCMDPILILMHელიNHAMHNLGYIAIPNDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPT
 IDLIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKLI RKYRFVVESSGEVTVNRNK
 FVELYNELTQIFTEFNKYIYVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNI PKSNLNLVFMGQNL
 SRNPALRKVNPNENMLYLFTKFCVDAIDGRSLYKNTLQCRELLVKNTDL PFI GDISDVKTDIFLRKDI
 ETEVIYYPDNVSDQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFDNRNTQNVYDLSNYYYLESQ
 KLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGFLMWANDVVEDFTTNILRKTDLDKI
 SDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEAFVAVTGVTTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIKITID
 NCLEQRIKRKWDSEYEMMGWLSRIITQFNISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKYSKSDKENIKSQ
 VENLKNSLDVKISEAMNINIKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNII LVGEV
 DKLKAKVNNSFQNTIPFNIFSYTNNLLKDIINEYFNLEGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSSALVDR
 MPCRNFFWKTFTSSCK

5

30. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST29-GS15-LHA

EFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWIIPERDFTNPEEGDLNPPPEAKQVPV
 SYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTKLFERIYSTD LGRMLLTSIVRGI PFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQ
 PDGYSRSEELNLVLIAGPSADI IQFECLSFSGHEVLNLRNNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL
 GAGKFAFDPAVTLAHELHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSL
 QENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLT
 EIYTEDNFVKKFVLRNRYLNFDAKVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRTNLANFNGQNTIENNMNFTK
 LKNFTGLFEFYKLLCVDGIITSKTKSDDDDKKNALNLQCIKVNWDLFFSPPSEDNFTNDLNKGEIITSD
 TNIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHY
 LRAQEFHGHKSRIALTNVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFDETSEVS
 TTDKADITIIIPYIGPALNINMGLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLT
 VQITIDNALSKRNEKWDEVYKIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEBEKN
 NINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRELEDFDASLKDALLKYIYDNRGT
 LIGQVDRLLKDKVNNTLSTDI PFIQLSKYVDNQRLLSTLEGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSSALVQEGAPPQQSARRD
 RMPCRNFFWKTFTSSCK

31. Secuencia de proteína de la fusión CT-CST29-GS30-LHB

PVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGGRYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFNKSSGIFNRDV
 CEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRKIKSKPLGEKLEMIINGIPYLGDRRVPLEEFNTNIASVTVN
 KLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNHFASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQE
 NKGASIFNRRGYFSDPALILMHLELHVHGLYGIKVDDLPIVNPNEKFFMQSTDALQAEELYTFGGQDP
 SIITPSTDKSIYDKVLQNFRIIVDRLNKVLVCI SDPNINININIKNFKDKYKFVEDSEGGKYSIDVESFD
 KLYKSLMFGFTETNIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYIEEGFNI SDKDMEKEYRGQNK
 INKQAYBEISKEHLAVYKIQMCVDGIITSKTKSDDDDKNKALNLQCIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLK
 NERIEYNTQSNYIENDFPINELILDLDLISKIELPSENTESLTDFNVDVVPVYEKQPAIKKIFTDENTIF
 QYLYSQTFPLDIRDISLTSSFDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVNDFVIEANK
 SNTMDKLIADISLIVFYIGLALNVGNETAKGNFENAFETAGASILLEFIPELLIPVVGAFLLSEYIDNKN
 KIIKTIDNALTKRNEKWSMDYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEEIKYRYNIYSEKE
 KSNINIDFNDINSKLNENINQAINNINNFINGCSVSYLMKKMIPLAVEKLLDFDNTLKNLLNYIDENK
 LYLIGSAEYKSKVKNKYLKTI MPFDLSITYNDTILIEMFNKYNSLEGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG
 GSGGGGSSALDQEGAPPQOSARRDRMPCRNFFWKTFSSCK

32. Secuencia de ADN de IgA-H₁tet

ggatccATGGAGTCCAATCAGCCGAAAAAATGGAACCGCGACTAAACCCGAGAATTCGGGGAACACT
 ACGTCGGAAAAACCGCCAGACGGAACCTGAGAAGAAACTGGAACACTCGAAATGTGTCCGATATCGAGCTA
 TACTCTCAAACCAATGGAACCTATAGGCAGCATGTTTCATTGGACGGAATCCAGAAAAATACGGATACA
 TATTTCTGTCAAAGTGAAGTCTAGCGCATCAAGGATGTATATATCCCGTTGCGAGTATTACAGAAGAG
 AAGCGGAACGGTCAAAGCGTTTATAAGATTACAGCAAAGGCCGAAAAAGTTACAACAGGAGTTAGAAAAAC
 AAATACGTTGACAAATTTCACTTTTATCTCGATAAAAAGGCTAAAGAGGAAAAACGAACTTACAGTCA
 TTTAGTAATCTGGTCAAAGCCATAAATCAAATCCATCTGGTACATACCATCTCGCGCAAGTCTAAAC
 GCGAATGAAGTAGAACTTGGCCCGGACGAGCGTTCATACATTAAGGATACCTTTACTGGCAGACTCATA
 GGGGAAAAAGACCGTAAGAACTATGCTATATACAATTTGAAAAAGCCTTTATTTGAGAACCCTGTCCGGC
 GCCACCGTCGAGAAATGTCCCTAAAAACGTAGCTATAAGCGGAAAGAATGACATCGGTAGTCTTGCA
 AACGAGGCTACTAACGGGACAAAGATTAACAAGTGCACGTAGATGGGtggtgcgacggcatcattacc
 tccaaaactaaatctgacgatgacgataaaaaacaaagcgctgaacctgcagtgcatataaataaagaat
 gaggatttgacattcatcgcaaaaaaataagcttcagcgaagagccggtccaagatgagatagtaagc
 tacaacaccaagaacaagccgcttaattttaattactcgtagataaaatcatagttgactacaacctt
 caatcgaagatcaggttacggaatgacagaacaactcctgtcacaagaaggaattccctatgcacctgag
 tataagtcaaatgcccgcgtcaacaatagagattcataatatagatgacaacaccatctatcaatatctg
 tacgctcagaaaaagtcacaacaactcttcagcgtataaacaatgaccaatagtgctcgatgacgcattgata
 aattctaccaagataactcttattttcccgagcgtcatctccaaagttaatcaaggtgctcaaggcatt
 ctatttttgcaatgggtccgagacatcatagatgacttcactaatgagtcgctcagaaaaccacgatt
 gataaaatcatagatgtttccaccatcgccccctacatcggaacctgcgcttaacattgtgaagcagggg
 tatgaggggaattttatcgagcgttagaaactacgggggttggtgctattacttgaatacataccagag
 ataacattgcccgttatagccgctcagtcagatcgcagaatcaagtagacacaaaagaaaagataatcaaa
 acaatcgacaactcctagaaaagaggtacgaaaaatggatagaggtttataaaactcgtgaaagcga
 tggttaggcactgttaatacgcagttccaaaagagatcctatacaaatgtatagatcactggagtagcag
 gtggatgccataaagaaaatcgcactatgaatataaaatataatcaggtccagataaggagcagata
 gctgatgaaataaacaatttaaaaaaacaacttgaagagaaggcgaataaggccatgatcaatatcaat
 atttttatcgagaatcttcacgatctttttggttaaatcagatgatttaacgaagccaaaagcagctg
 cttgagttcgacacacagtcacaaaacataactaatgcaatataatcaagcaaaactcaaaattcattgga
 attactgagctgaagaaactggaatccaaaataaataaagattctctaccccgatcccgttctcttacc
 tcaaaaaccttgactgctgggtagataacgaagaagatattgacgcttctagagtaataagctt

33. Secuencia de proteína de la fusión CT-GHRP-LHC

PITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNPNLNKP PPRVTS PKSG
 YYDPNYLSTSDSKDTFLKEIKLFKRINSREIGEELIYRLSTDI PFPGNNTPIINTFDVDVFNVDVK
 TRQGNVWKTGSINPSVITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSII SISPFRMLTYSNATND
 VGEGRFSKSEFCMDPILILMHELNHAMHNLGYIAIPNDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPT
 IDLIPKSARKYFEKALDYYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKLIKRYRFVVESSGEVTVNRNK
 FVELYNELTQIFTEFNKYAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNI PKSNLNLVLFMGQNL
 SRNPALRKVNPNENMLYLFKFCVDAIDGRSLYNKTLQCRELLVKNTDLPIGDISDVKTDIFLRKIDINE
 ETEVIYYPDNVSVQVILSKNTSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQNVYDLYNSYYLESQ
 KLSDNVEDFTFTRSEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGFLMWANDVVEDFTTNILRKDTLDKI

5

SDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEFAVTVGVTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIKTID
 NCLEQRIKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNSIYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQ
 VENLNKSLDVKISEAMNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNII L VGEV
 DKLKAKVNNSFQNTIPFNIFSYTNNLLKDIINEYFNLEGGGGSGGGSGGGSSALVGSFSLSPHQVR
 QQRKESKKPPAKLQPR

34. Secuencia de proteína de la fusión CT-GHRH-LHD

TWPVKDFNYSDFVNDNDILYLRI PQNKLIITTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI I KLFKR INERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDT FDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKVVTNI ITPSVLIFGPLPNILDYASLT LQGQSNPSFEGFGTLSILKV APEFLLTFS DVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRI RPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGG LD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVNI DK
 FNSLYSDLTNMSEVVYSSQYVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTI RDGFNLTNKGFNIE NSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEKLYDDDDKDRWGSSLQCI KVKNNR LPYVADKDSISQEI FEN
 KIITDET NVQNYSDKFLDES ILDGQVPINPEI VDP LLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLSY
 YYLESQKLSNNVENITLTSVEEALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKK
 DTLDKISDVSVI I PYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGGFPEFTIPALGVFTFYSSI QEREK
 I I KTIENCLEQRV KRWKDSYQW MVSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYK KYSGSDK
 ENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFKNM LPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI
 ILVGEVDR LKAKVNESFENTMPFNI FSYTNN SLLKDI INEYFNLEGGGGGGGGGGSSALVYADAI F
 TNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQGESNQRGA

35. Secuencia de proteína de la fusión CT-GHRP-LHD

TWPVKDFNYSDFVNDNDILYLRI PQNKLIITTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI I KLFKR INERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDT FDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKVVTNI ITPSVLIFGPLPNILDYASLT LQGQSNPSFEGFGTLSILKV APEFLLTFS DVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRI RPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGG LD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVNI DK
 FNSLYSDLTNMSEVVYSSQYVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTI RDGFNLTNKGFNIE NSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEKLYDDDDKDRWGSSLQCI KVKNNR LPYVADKDSISQEI FEN
 KIITDET NVQNYSDKFLDES ILDGQVPINPEI VDP LLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLSY
 YYLESQKLSNNVENITLTSVEEALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKK
 DTLDKISDVSVI I PYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGGFPEFTIPALGVFTFYSSI QEREK
 I I KTIENCLEQRV KRWKDSYQW MVSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYK KYSGSDK
 ENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFKNM LPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI
 ILVGEVDR LKAKVNESFENTMPFNI FSYTNN SLLKDI INEYFNLEGGGGGGGGGGSSALVGS SFLS
 PEHQRVQQRKESKPPAKLQPR

36. Secuencia de proteína de la fusión CT-grelina-LHA

EFVNKQFNKYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKA FKIHNKI WVI PERDFTNPEEGDLNPPPEAKQVPV
 SYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKL FERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQ
 PDGSYRSEELNLVIIGPSADI IQFECKSFGEVNLNLRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL
 GAGKFATDPAVTLAHEL IHAGHRLYGI AINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGCHDAKFIDSL
 QENEFRLYYNKF KDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLEDSTSGKFSVDKLFKFKLYKMLT
 EIYTEDNFVKFKVNLNRTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNT EINNMF TK
 LKNFTGLFEFYKLLCVDGIITSKTKSDDDDKNKALNLQCI KVNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSD
 TNIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIE NLSSDIIGQLELMPNIE RFPNGK KYELDKYTMFHY
 LRAQEFHGSRIAL TNSVEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVS
 TTDKIADITIIIPYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLT
 VQTI DNALSKRNEKWDEVYKIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAATKAI INYQYNQYTEEEKN
 NINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGT
 LIGQVDRLKDKVNNLTSTDI PFQLSKYVDNQRLLSTLEGGGGGGGGGGSSALVGS SFLSPEHQRVQ
 QRKESKPPAKLQPR

5

37. Secuencia de proteína de la fusión IgA-H₂tet-CT-SST14

ESNQPEKNGTATKPENSGNTTSENGQTEPEKKLELRNVS DIELYSQTNGTYRQHVSLDGI PENTDITYFVKV
 KSSAFKDVYI PVASITTEKRNQSVYKITAKAEK LQEQELENKYVDNFTFYLDKKAKEENTNFTSFSNLVKA
 INQNPSGTYHLAASLNANEVELGPDERSYIKDTFTGR LIGEKDGKNYAIYNLKKPLFENLSGATVEKLSLK
 NVAISGKNDIGSLANEATNGTKIKQVHV DGCVDGIITSKTKSDDDDKNKALNLQCI KIKNEDLTFIAEKNS
 FSEEPFQDEIVSYNTKNKPLNFNYS LDKIIVDYNLQSKITL PNDRTTPVTKGIPYAPEYKSNAASTIEIHN
 IDDNITYQYLYAQKSPTTLQRITMNSVDDALINSTKIYSYFPSVISKVNQGAQGILFLQWVRDIIDDFTN
 ESSQKTTIDKISDVSTIVPYIGPALNIVKQGYEGNFIGALET TGVLLEYIPEITLPVIAALSIAESSTQ
 KEKIKTIDNFLEKRYEKWIEVYKLVKAKWLGTVNTQFQKRSYQMYRSLEYQVDAIKKI IDYEYKIYSGPD
 KEQIAD EINNLNKLEBKANKAMININKFMRBSSRSLVNQMINAEAKQLLEFDTQSKNILMQYIKANSKF
 IGITELKKLESKINKVSTPI PFSYSKNLDCWVDNEEDIDVLEGGGGGGGGGGSSALVAGCKNFFWKT
 FTSC

38. Secuencia de proteína de la fusión IgA-H₂tet-CT-GHRP

ESNQPEKNGTATKPENSGNTTSENGQTEPEKKELELRNVSDIELYSQTNNGTYRQHVSLDGI PENTDITYFVKV
 KSSAFKDVYI PVASITEEKRNGQSVYKITAKAEKQQELENKVVDNFTFVLDKKAKEENTNFTSFSNLVKA
 INQNPSTGYHLAASLNANEVELGPDERSYIKDTFTGRLIGEKDGKNYAIYNLKKPLFENLSGATVEKLSLK
 NVAISGKNDIGSLANEATNGTKIKQVHVDGCVDDGIITSKTKSDDDDKNKALNLQCIKIKNEDLTFIAEKNS
 FSEEPFQDEIVSYNTKKNPLNFNYSLDKIIVDYNLQSKITLPPNDRTTPVTGIPYAPEYKSNAASTIEIHN
 IDDNFTIYQYLYAQKSPTTLQRITMTNSVDDALINSTKIYSYPPSVISKVNQGAQGILFLQWVRDIIDDFTN
 ESSQKTTIDKISDVSTIVPYIGPALNIVKQGYEGNFIGALETGTVVLLLEYIPEITLVPVIAALSIAESSTQ
 KEKIKTIDNFLEKRYEKWIEVYKLVKAKWLGTVNTQFQKRSYQMYRSLEYQVDAIKKIIDYEYKIYSGPD
 KEQIADENLKNKLEKANKAMININIFMRESSRSFLVNQMINAEAKQLEFDTQSKNILMQYIKANSKF
 IGITELKKLESKINKVSTPIPFYSYKNLDCWVDNEEDIIDVLEGGGGSGGGSGGGSSALVGSFSLSPHQ
 RVQQRKESKPPAKLQPR

39. Secuencia de proteína de la fusión CT-grelina S3W-LHA

EFVKNQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWVPERDFTTNPEEGDLNPPPEAKQVPVSY
 YDSTYLDSTNEKDNYLKGVTKLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGI PFWGGSTIDTELKVITDNCINVIQPDGS
 YRSEELNLVIGPSADIQFECKSPGHEVLNLRNNGYSGTQYIRFSPDFTFGFEESELEVDTNPLLAGAKFA
 TDPAVTLAHELHAGHRLYGIANPNRVFKVNTNAYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLY
 YYNKFKDIASLTNKAISIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLEDTSKGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVK
 FFKVLNRKTYLNFDAKAVKINIVPKVNYTIYDGFNLRNTNLAANFNGQNTENNMMFTKLKNFTGLFEPYK
 LLCVDGIITSKTKSDDDDKNKALNLQCIKVNNDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNEAAEENISLDDL
 IQQYLYTFNFDNEPENISIEENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFHEGKSRIALT
 NSVNEALLNPSRVYTFSSDYVVKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPIYIGPA
 LNIENMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEAIIPVLGTALVSYIANKVLTVQTDNALSKRNEKWEVYK
 YIVTNWLAKVNTQIDLIRKMKKEALENQAETKAIINYQYNQYTEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMI
 NINKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRDKDKVNNLTSTDI PPQL
 SKYVDNQRLSTLEIYALVGSWFLSPEHQVQQRKESKPPAKLQPR

40. Secuencia de proteína de la fusión CT-GRP-LHD

TWPVKDFNYSDFVNDNDILYLRIPQNKLIITPVKAFMITQNIWVPERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLDSTDEQKDTFLKGIKLFKRIINERDIGKLLINYLTVGSPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNIIITPSVLIIFGFLPNILDYASLTLQGGQSNPSFEGFGLSILKVAPEFLTLTFSVDTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHETHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFPSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDIKRLNINIKTI PPSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKNTGNFVVDIK
 FNSLYSDLTNVMSSEVVYSSQYVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTRDGFNLTNKGFNIENTSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEEKLYDDDDKDRWGSSLQCIKVNKRLPYVADKDSISQEIFEN
 KIITDETNTVQNYSDKFSLDESILDGQVPINPEIIVDPLLPNVNMPEPLNLPGEIIVFYDDITKYVDYLSY
 YYLESQKLSNNVENITLTSVVEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKGVQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKK
 DTLDKISDVSVIIPYIGPALNIGNSALRCNFNQAFATAGVALLEGFPFTIPALGVFTFYSSIQEREK
 IIKTIENCLEQRVWRKDSYQWVMSNWSRITTFNHINYQMYDLSYQADAIKAKIDLEYKKYSGSDK
 ENIKSQVENLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFKNMPLPKVIDELNKFDLRKTTELINLIDSHNI
 ILVGEVDRLLKAKVNESFENTMPFNI FSYTNNSLKDIINEYFNLEGGGGSGGGSGGGSSALVGNHWAV
 5 GHLM

41. Secuencia de proteína de la fusión CT-GRP-LHB

PVTINNPNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRIYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFNKSSGI FNRDV
 CEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIPYLGDRRVPLEEFNTNIA SVTVN
 KLISNPGEVERKKGIFANLIIIFGPGVNLNENETIDIGIQNHFASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQE
 NKGASIFNRRGYFSDPALILMHელიHVLHGLYGIKVDLPIVPNEKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDP
 SIITPSTDKSIYDKVLQFRGIVDRLNKVLVCISDPNININIYKNKFKDKYKFVEDSEGGKYSIDVESFD
 KLYKSLMFGFTEINIAENYIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIIEGFNISDKDMEKEYRGQKA
 INKQAYEEISKEHLAVYKIQMCVDEEKLYDDDDKDRWGSSLQCIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKNER
 IEYNTQSNYIENDFPINELILDTDLISKIELPSENTESLTDPNVDVPVYEKQPAIKKIIFTDENTIFQYL
 YSQTFFPLDIRDISLTSFDDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAWVKQIVNDFVIEANKSNT
 MDAIADISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLESYIDNKNKII
 KTIDNALTNRNEKWSMDYGLI VAQWLSVTNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEEIKYRYNIYSEKEKSN
 INIDFNDINSKLNIGINQAIDNINNFINGCSVSYLMKKMIPLAVEKLLDFDNTLKKNLLNYIDENKLYL
 IGSABEYKSKVNKYLKTIIMPFDLSIYTNDTILIEFMNKYNSLEGGGGSGGGSGGGSSALVGNHWAVGH
 LM

42. Secuencia de proteína de la fusión CP-qGHRH29-LHD

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

43. Secuencia de proteína de la fusión CP-qGHRH-LHA

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

44. Secuencia de proteína de la fusión CP-qGHRH-LHC

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

5

45. Secuencia de proteína de la fusión CP-qGHRH-LHD

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

46. Secuencia de proteína de la fusión CP-qGHRH-LHD N10-PL5

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGLPNILDYASLT LQGGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFS DVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEI I PQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVVDK
 FNSLYSDLTNMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIY TIRDFGNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDNNNNNNNNDDDDKHVDAI FTQSYRQVLAQLSARKLLQDILNRQ
 QGERNQEQGAPAPAPLQCI KVKNNR LPYVADKDS ISQEI FENKI ITDET NVQNYSDKFSLDES ILDGQV
 PINPE IVDPLLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLSY YLESQKLSNNVENITLTSVVEALGY
 SNKIYTFPLPSLAEKVNGVQAGLFLN WANEVVEDFTNIMKKDTLDKI SDVSVI IPYIGPALNIGNSAL
 RGNFNQAFATAGVAFLLEGFP EFTI PALGVFTFYSSIQEREKI I KTIENCLERQVRKWKDSYQWVMSNW
 LSRI TTFQFNHINYQMYDSL SYQADAI KAKIDLEYK KYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMNINK
 FIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKF DLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNIFS
 YTNNSLLKDI INEYFN

47. Secuencia de proteína de la fusión CP-qGHRH-LHD N10-HX12

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTSKYQSY
 DPSYLSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVEKFE
 GSWKVTNI I TPSVLI FGLPNILDYASLT LQGGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFS DVTSNQSSAVL
 GKSIFCMDPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLDVEI I PQIE
 RSQLEKALGHYKDI AKRLNNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVVDKFN SLYSDLTN
 VMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIY TIRDFGNLTNKGFN IENSGQNIERNPALQKLSSE
 SVVDLFTKVCVDNNNNNNNNDDDDKHVDAI FTQSYRQVLAQLSARKLLQDILNRQQGERNQEQGAEAAA
 KEAAAKALQCI KVKNNR LPYVADKDS ISQEI FENKI ITDET NVQNYSDKFSLDES ILDGQV PINPE IVDPL
 LPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLSY YLESQKLSNNVENITLTSVVEALGYSNKIYTFPLPSLA
 EKVNGVQAGLFLN WANEVVEDFTNIMKKDTLDKI SDVSVI IPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVA
 FLLEGFP EFTI PALGVFTFYSSIQEREKI I KTIENCLERQVRKWKDSYQWVMSNWSRI TTFQFNHINYQMY
 DSLSYQADAI KAKIDLEYK KYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMNINK FIRECSVTYLFKNMLPKV
 IDELNKF DLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNISYTNNSLLKDI INEYFN

48. Secuencia de proteína de la fusión CP-UTS-LHA

EFVKNQFNKYKDPVNGVDIAYIKI PNAGQM QPVKAFKIHNKIWV IPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPV
 SYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKL FERIYSTD LGRMLLTSI VRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQ
 PDGSRSEELNLVI IGPSADI IQFECKSF GHEVLNLRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL
 GAGKFATDPAVTLAHEL I HAGHRLYGI AINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFI DLSL
 QENEFRLYYNKF KDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLEDTS GKFSVDKLFKDKLYKMLT
 EIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINI VPKVNYTIDYDGNL RNTNLAANFNGQNT EINNMF TK
 LKNFTGLFEFYKLLCVDGGGGSADDDKND PPI SIDLTFHLLRNMI EMAR IENEREQAGLNRKYLDEV
 ALAGGGGSGGGGSGGGGSALVQCI KVNNDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLI
 QQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDI IGQLELMPN IERFPNGK KYELDKYTMFHYLRAQEF EHGKSRIAL
 TNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETS EVSTTDKIADITII IPYI
 GPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVIL LEF IPEIAIPVLGTFALVSY IANKVLT VQTIDNALS KRNEKW
 DEVYKIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKAI INYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSK LNE
 SINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVK RLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNN T
 LSTDIPFQLSKYVDNQRL LST

5

49. Secuencia de proteína de LH_N/A

EFVKNQFNKYKDPVNGVDIAYIKI PNAGQM QPVKAFKIHNKIWV IPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPV
 SYYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKL FERIYSTD LGRMLLTSI VRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQ
 PDGSRSEELNLVI IGPSADI IQFECKSF GHEVLNLRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVDTNPLL
 GAGKFATDPAVTLAHEL I HAGHRLYGI AINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFI DLSL
 QENEFRLYYNKF KDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLEDTS GKFSVDKLFKDKLYKMLT
 EIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINI VPKVNYTIDYDGNL RNTNLAANFNGQNT EINNMF TK
 LKNFTGLFEFYKLLCVDGIITSKTKSDDDDKNKALNLQCI KVNNDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSD
 TNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDI IGQLELMPN IERFPNGK KYELDKYTMFHY
 LRAQEF EHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETS EVS
 TTDKIADITII IPYI GPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVIL LEF IPEIAIPVLGTFALVSY IANKVLT
 VQTIDNALS KRNEKWDEVYKIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKAI INYQYNQYTEEEKN
 NINFNIDDLSSK LNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVK RLEDFDASLKDALLKYIYDNRGT
 LIGQVDRLKDKVNN T LSTDIPFQLSKYVDNQRL LST

50. Secuencia de proteína de LH_N/B

PVTINNPNFYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGGRYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFNKSSGIFNRDV
 CEYYDPPYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIPYLGDRRVPLEEFNTNIASVTVN
 KLISNPGEVERKKGIIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNHFAASREGFGGIMQMKFCPEYVSVFNNVQE
 NKGASIFNRGRGYSDPALILMHELHVLHGLYGIKVDDLPIVPNEKKFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDP
 SIITPSTDKSIYDKVLQNFGRGIVDRLNKVLVCISDPNINININIKNFKDKYKFVEDSEGGKYSIDVESFD
 KLYKSLMFGFTEETNAENYKIKTRASYSFSDSLPPVKIKNLLDNEIYIEEGFNI SDKMEKEYRGQNK
 INKQAYEEIISKEHLAVYKIQMCVDEEKLYDDDDKDRWGSSLQCIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKNER
 IEYNTQSNYIENDFPINELILDLDLISKIELPSENTESLTDFNVDPVYEQPAIKKIPTDENTIFQYL
 YSQTFFLDIRDISLTSFDDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGVVKQIVNDFVIEANKSNT
 MDAIADISLIVPYIGLALNVGNETAAGNFENAFIAGASILLEFIPPELLIPVVGAFLEESYIDNKNKI
 KTIDNALTNRNEKWSMDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEETIKYRYNIYSEKESN
 INIDFNDINSKLNENQAINNFINNGCSVSYLMKKMPLAVEKLLDFDNTLKNLLNLYIDENKLYL
 IGSABEYKSKVNKYLKTIIMPFDLSIYTNDFILIEFMFNKYS

51. Secuencia de proteína de LH_N/C

PITINNPNFYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNPNLNKPRTVTSKSG
 YYDPNYLSTDSKDTFLKEIKLFRKINSREIGEELIYRLSTDIFFPGNNTPINTDFDVFDFNSVDVK
 TRQGNWVKTGSINPSVITGPRENIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSILSISPRFMLTYSNATND
 VEGEGRFSKSEFCMDPILILMHELHAMHNLGYIAIPNDQTISSVTSNIFYSQYNVKLEYAEIYAFGGPT
 IDLIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKLRKYRFVVESSGEVTVNRNK
 FVELYNELTQIFTFEFNYAKIYVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNI PKSNLNLVLFMGQNL
 SRNPALRKVNPNEMLYLFTKFCVDAIDGRSLYKNTLQCRELLVKNTDLFFIGDISDVKTDIFLRKINE
 ETEVIYFPDNVSDQVILSKNTSEHGQLDLYPSIDSESEILPGENQVFFYDNRTQNVYDLSYYYLESQ
 KLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGLFLMWANDVVEDFTTNILRKDTLDKI
 SDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFTEFAVTVGVTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIKITID
 NCLEQRKRWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKGSGSDKENIKSQ
 VENLNKSLDVKISEAMNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNILLVGEV
 DKLKAKVNNSFQNTIPFNI FSYTNNSLLKDI INEYFN

52. Secuencia de proteína de LH_N/D

TWPVKDFNYSDFVNDNDIYLRIIPQNKLIITPVKAFMITQNIWVIPERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLDSTDEQKDTFLKGIKLFKRINERDIGKKLINYLTVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSKVVTNIITPSVLIIPGFLPNILDYASLTLOGQSNPSFEGFGTSLILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGGKSI FCMQPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIIPQVSEGFPSQDGNPNVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDIKRLNINIKTI PSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDNFTGNFVFNIDK
 FNSLYSDLTNMSEVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTRDGFNLTNKGFNIEENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEKLYDDDDKDRWGSSLQCIKVKNNRLLPYVADKDSISQEIFEN
 KIITDETNVQNSDKFSLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEIIVFYDDITKYVDYLSY
 YYLESQKLSNNVENITLTTVSVEEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKGVAQLFLNWNANVEVDFTTNIMKK
 DTLDKISDVSVIIPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREK
 IIKTIENCLEQRVWRKDSYQWVSNWLSRIITQFNHINYQMYDLSYQADAIKAKIDLEYKKGSGSDK
 ENIKSQVENLNKSLDVKISEAMNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI
 ILLVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI FSYTNNSLLKDI INEYFN

5

53. Secuencia de proteína de IgA-H_Ntet

ESNQPEKNGTATKPNESGNTTSENGQTEPEKKLELRNVSDIELYSQTNGTYRQHVSLDGI PENTDTYFV
 KVKSSAFKDVYIIPVASITEEKRNQGSVYKITA KAEKQQELENKYVDNFTFYLDKKAKEENTNFTSPSN
 LVKAINQNPSTGYHLAASLANEVELGPDERSYIKDTFTGRLIGEKDGKNYAIYNLKKPLFENLSGATV
 EKLKSLKNVAISGKNDIGSLANEATNGTKIKQVHVDGCVDGIITSKTSDDDDKKNALNLQCIKIKNEDL
 TFI A EKNSFSEEPQDEIVSYNTKNKPLNFYSLDKIIVDYNLQSKITL PNDRTTPVTGIPYAPEYKS
 NAASTIEIHNIDDNTIYQYLYAQKSPPTLQRITMTNSVDDALINSTKIYSYFSPVISKVNQGAQGI LFL
 QWVRDIIDDFTNESQKTTIDKISDVSTIIPYIGPALNIVKQGYEGNFIGALETGTGVLLLEYIPEITL
 PVIAALSIAESSTQKEKIKITIDNFLEKRYEKWIEVYKLVKAKWLGTVNTQFQKRSYQMYRSLEYQVDA
 IKKIIDYBYKIYSGPDKEQIADENLNKLNKLEEKANKAMININIFMRESSRSFLVNQMINAEKQLLEF
 DTQSKNILMQYIKANSKFIGITELKLESKINKVFTPIPFYSYKNLDCWVDNEEDIDV

54. Péptido de Octreotide sintetizado

Cys-Dphe-Cys-Phe-Dtrp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol

10 55. Péptido agonista de GHRH sintetizado

HIS-ALA-ASP-ALA-ILE-PHE-THR-ASN-SER-TYR-ARG-LYS-VAL-LEU-GLY-GLN-LEU-
 SER-ALA-ARG-LYS-LEU-LEU-GLN-ASP-ILE-NLE-SER-ARG-CYS

56. Péptido antagonista de GHRH sintetizado

PhAc-Tyr-D-Arg-Asp-Ala-Ile-Phe(4-Cl)-Thr-Ala-Har-Tyr(Me)-His-Lys-Val-
 Leu-Abu-Gln-Leu-Ser-Ala-His-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Nle-D-Arg-Har-CYS

57. Secuencia de proteína de CP-MCH-LHD

TWPVKDFNYSDFVNDNDIYLRI PQNKLIITPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI ITPSVLIFGPLPNILDY TASLTLQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNNINKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFVVNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYPVFANILDDNIY TIRDFGNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKDFDMLRCMLGRVYR PCWQVALAKRLVLQCI K
 VKNNRLLPYVADKDSISQEI FENKIITDETNVQNYSDKFSLDES ILDGQVPINPEI VDP LLPNVNMEPLN
 LPGEEIVFYDDITKYVDYLSY YLESQKLSNNVENITL TTSVEEALGYSNKIY TFLPSLAEKVNKG VQ
 AGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTL DKISDVSVI I PYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGF
 PEFTIIPALGVFTFYSSI QEREKI I KTIENCLEQRVKRWKDSYQW MVSNWLSRIT TQFNHINYQMYDSL S
 YQADAIKAKIDLEYK KYSGSDKENIKS QVENLKNSLDVKI SEAMNIN KFI RECSVTYLFKNMLPKVID
 ELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNIFSYTNN SLLKDI INEYFN

58. Secuencia de proteína de CT-KISS-LHD

TWPVKDFNYSDFVNDNDIYLRI PQNKLIITPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI ITPSVLIFGPLPNILDY TASLTLQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNNINKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFVVNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYPVFANILDDNIY TIRDFGNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEKLYDDDDKDRWGSSLQCI KVKNRLLPYVADKDSISQEI FEN
 KIITDETNVQNYSDKFSLDES ILDGQVPINPEI VDP LLPNVNMEPLNLPGEEIVFYDDITKYVDYLSY
 YLESQKLSNNVENITL TTSVEEALGYSNKIY TFLPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKK
 DTLDKISDVSVI IPYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIIPALGVFTFYSSI QEREK
 I I KTIENCLEQRVKRWKDSYQW MVSNWLSRIT TQFNHINYQMYDSL S YQADAIKAKIDLEYK KYSGSDK
 ENIKS QVENLKNSLDVKI SEAMNIN KFI RECSVTYLFKNMLPKVIDELNKF DLRTKTELINLIDSHNI
 ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNIFSYTNN SLLKDI INEYFNLEGGGGSGGGSGGGGSALVYNWNSF
 GLRFG

5 59. Secuencia de proteína de CT-PrRP-LHA

EFVNKQFNKDPVNGVDIAY I KIPNAGQMOPVKA FKIHNKIWV IPERDTFTNPEEGDLNPPPEAKQVPV
 SYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKL FER IYSTD LGRMLLTSI VRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQ
 PDGSYRSEELNLVI IGPSADI IQFECKSPGHEVLN LTRNGYGSTQYIRFS PDFTFGFEESLEVD TNPLL
 GAGKFATDPAVTLAHEL IHAGHRLYGI AINPNRVFKVNTNAYYEMSGLEVSFEELRTFGGHDAKPIDSL
 QENEFRLYYYNKF KDIASTLNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKYLLSEDTSGKFSVDK LKFDKLYKMLT
 EIYTEDNFVKKFV LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYT IYDGFNLRNTNLAANFNGQNT EINNMF TK
 LKNFTGLFEFYKLLCVDGI I TSKTKSDDDDKKNALNLQCI KVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSD
 TNIEAAEENISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDI IGQLELMPNIERFPNGK KYELD KYTMFHY
 LRAQEFEHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKVKNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVS
 TTDKIADITIIIPYIGPALNIGNM LYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEI AIPVLGTFALVSYIANKVLT
 VQTI DNALSKRNEKWD EYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKAI INYQNYTEEBEKN
 NINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQC SVSYLMNSMI PYGVKRL EFDASLKDALLKYI YDNRGT
 LIGQVDRLKDKVNTLSTDI PFQLSKYVDNQRLLS TLEGGGGSGGGSGGGGSALVTPDINPAWYASRG
 IRPVGRFG

60. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_1-27-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLIITTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGPLPNILDYASLT LQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNIN KTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDFGNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMALAG
 GGGGGGGGGGGGSALALQCIKVKNRNL PYVADKDSISQEIFENKI ITDETNVQNYSDKFSLDESILDG
 QVPINPEIVDPLLPVNMPELNLPGEEIVFYDDITKYVDYLN SYYLESQKLSNNVENITLTT SVEEAL
 GYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVI I PYIGPALNIGNS
 ALRGNFNQAFATAGVAFLLLEGFP EFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTI ENCLEQRV KRWKDSYQWMVS
 NWLSRIT TQFNHINYQMYDSL SYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMNNI
 NKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI
 FSYTNN SLLKDI INEYFN

61. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_1-28-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLIITTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGPLPNILDYASLT LQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNIN KTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDFGNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSALA
 GGGGGGGGGGGGSALALQCIKVKNRNL PYVADKDSISQEIFENKI ITDETNVQNYSDKFSLDESILD
 GQVPINPEIVDPLLPVNMPELNLPGEEIVFYDDITKYVDYLN SYYLESQKLSNNVENITLTT SVEEA
 LGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVI I PYIGPALNIGN
 SALRGNFNQAFATAGVAFLLLEGFP EFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTI ENCLEQRV KRWKDSYQWMV
 SNWLSRIT TQFNHINYQMYDSL SYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMN
 INKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFN
 IFSYTNN SLLKDI INEYFN

62. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_1-29-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLIITTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGPLPNILDYASLT LQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNIN KTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFVVDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDFGNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRA
 LAGGGGGGGGGGGGSALALQCIKVKNRNL PYVADKDSISQEIFENKI ITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLLPVNMPELNLPGEEIVFYDDITKYVDYLN SYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVI I PYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLLLEGFP EFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTI ENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYDSL SYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNN SLLKDI INEYFN

5

63. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_1-44-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERD I GKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGP LPNILDY TASLTLQGQQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFS DVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEI IPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFVFNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIR DGFNLTNKG FN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMS RQQ
 GESNQERGARARIALAGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNR LPYVADKDS ISQEIFENKI ITDET N
 VQNYSDKFSLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLNSYYLESQKL
 SNNVENITLTT SVEEALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMK KDTLDKI SD
 VSVI I PYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI IKTIENC
 LEQRVKRWKDSYQWMVSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVE
 NLKNSLDVKI SEAMNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDR
 LKAKVNESFENTMPFNIFSYTNN SLLKDI INEYFN

64. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_1-40-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERD I GKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGP LPNILDY TASLTLQGQQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFS DVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEI IPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFVFNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIR DGFNLTNKG FN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMS RQQ
 GESNQER GALAGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNR LPYVADKDS ISQEIFENKI ITDET NVQNS
 DKFSLDESILDGQVPINPEIVDPLLPNVMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLNSYYLESQKLSNNVE
 NITLTT SVEEALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMK KDTLDKI SDVSVI I
 PYIGPALNIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI IKTIENCLEQRV
 KRWKDSYQWMVSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNS
 LDVKI SEAMNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDR LKAKV
 NESFENTMPFNIFSYTNN SLLKDI INEYFN

5 65. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala9-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERD I GKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGP LPNILDY TASLTLQGQQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFS DVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEI IPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINKTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFVFNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIR DGFNLTNKG FN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTNAYRKVLGQLSARKLLQDIMS RAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNR LPYVADKDS ISQEIFENKI ITDET NVQNSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLLPNVMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLNSYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMK KDTLDKI SDVSVI I PYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI IKTIENCLEQRVKRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDR LKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNN SLLKDI INEYFN

66. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala22-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLIITPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSKVVTNIITPSVLI FGPLPNILDYASLT LQGQSNPSFEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGF FSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNIN KTI P SSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDN TGNFV VNI DK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIR DGFNLTKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSES VVDLFTKVCVDGIITSKTKSDDDDKYADAI FTNSYRKVLGQLSARKALQDIMS RAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCIKVKNNR LPYVADKDSISQEIFENKIITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLLPVNM EPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLN WANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLL EGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKI IKT IENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRITTTQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKS QVENLKNSLDVKISEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNM LPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHN IILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

67. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Lys11_1-29-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLIITPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSKVVTNIITPSVLI FGPLPNILDYASLT LQGQSNPSFEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGF FSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNIN KTI P SSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDN TGNFV VNI DK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIR DGFNLTKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSES VVDLFTKVCVDGIITSKTKSDDDDKYADAI FTASYKKVLGQLSARKLLQDIMS RAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCIKVKNNR LPYVADKDSISQEIFENKIITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLLPVNM EPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLN WANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLL EGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKI IKT IENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRITTTQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKS QVENLKNSLDVKISEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNM LPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHN IILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

68. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Lys11_Arg12_1-29-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLIITPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSKVVTNIITPSVLI FGPLPNILDYASLT LQGQSNPSFEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGF FSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNIN KTI P SSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDN TGNFV VNI DK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIR DGFNLTKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSES VVDLFTKVCVDGIITSKTKSDDDDKYADAI FTASYKRVLGQLSARKLLQDIMS RAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCIKVKNNR LPYVADKDSISQEIFENKIITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLLPVNM EPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLN WANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLL EGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKI IKT IENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRITTTQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKS QVENLKNSLDVKISEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNM LPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHN IILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

5

69. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Asn11_1-29-LHD

TWPVKDFNYSDFVNDNDILYLRI PQNKLIITPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKWVTNI ITPSVLIFGPLPNILDYASLT LQGQSNPSFEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVNVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINIKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDNTGNFVVDNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDFNLTNKGFNIESSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTASYNKVLGQLSARKLLQDIMSRA L
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNRNPYVADKDSISQEI FENKIITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLL PNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTTSVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKI I KTIENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRITTFQFNHINYQMYDLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKS QVENLNKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

70. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Lys20_1-29-LHD

TWPVKDFNYSDFVNDNDILYLRI PQNKLIITPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKWVTNI ITPSVLIFGPLPNILDYASLT LQGQSNPSFEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVNVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINIKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDNTGNFVVDNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDFNLTNKGFNIESSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTASYR KVLGQLSARKLLQDIMSRA L
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNRNPYVADKDSISQEI FENKIITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLL PNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTTSVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKI I KTIENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRITTFQFNHINYQMYDLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKS QVENLNKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

5 71. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS-CHRH-Ala8_Lys11_Lys20_1-29-LHD

TWPVKDFNYSDFVNDNDILYLRI PQNKLIITPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSKWVTNI ITPSVLIFGPLPNILDYASLT LQGQSNPSFEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCMDFVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVNVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNINIKTIPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDNTGNFVVDNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDFNLTNKGFNIESSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTASYK KVLGQLSARKLLQDIMSRA L
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNRNPYVADKDSISQEI FENKIITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLL PNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTTSVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKI I KTIENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRITTFQFNHINYQMYDLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKS QVENLNKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

72. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Asn20_1-29-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKL INYL VVGSPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSWKV TNII TPSVLI FGPLPNILDY TASLTLQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFFSQDGPVNVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFV VNI DK
 FNSLYSDL TNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNI YTI RDGFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSES VVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTASYR KVLGQLSANKLLQDIMS RAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNR LPYVADKDS ISQEI FENKI ITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLL PNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDY LNSYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKI SDVSVI IPIYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTIENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

73. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Asn12_1-29-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKL INYL VVGSPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSWKV TNII TPSVLI FGPLPNILDY TASLTLQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFFSQDGPVNVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFV VNI DK
 FNSLYSDL TNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNI YTI RDGFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSES VVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTASYR NVLGQLSARKLLQDIMS RAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNR LPYVADKDS ISQEI FENKI ITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLL PNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDY LNSYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKI SDVSVI IPIYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTIENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

74. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Asn21_1-29-LHD

5 TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNP SLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKL INYL VVGSPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVE
 KFENGSWKV TNII TPSVLI FGPLPNILDY TASLTLQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFFSQDGPVNVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFV VNI DK
 FNSLYSDL TNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNI YTI RDGFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSES VVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTASYR KVLGQLSARNLLQDIMS RAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNR LPYVADKDS ISQEI FENKI ITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLL PNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDY LNSYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKI SDVSVI IPIYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTIENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

75. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Glu_7_1-29-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLIITPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD I GKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGP L PNI LDY TASLT LQGQSNPS FEGFGTLS I LKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPV I ALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVVDNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDGFNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FEASYRKVLGQLSARKLLQDIMS RAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNNR L PYVADKDSISQEI FENKI I TDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLLPNVNM EPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLSY YYLESQKLSNNVENITLTTSVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKI SDVSVI I PYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTIENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRITTTQFNHINYQMYDLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

76. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Glu_10_1-29LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLIITPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD I GKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGP L PNI LDY TASLT LQGQSNPS FEGFGTLS I LKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPV I ALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVVDNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDGFNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTASERKVLGQLSARKLLQDIMS RAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNNR L PYVADKDSISQEI FENKI I TDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLLPNVNM EPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLSY YYLESQKLSNNVENITLTTSVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKI SDVSVI I PYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTIENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRITTTQFNHINYQMYDLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

5 77. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_Glu_13_1-29-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLIITPVKAFMITQNIWV IPERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD I GKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGP L PNI LDY TASLT LQGQSNPS FEGFGTLS I LKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPV I ALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVVDNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDGFNLTNKGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTASERKELGQLSARKLLQDIMS RAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNNR L PYVADKDSISQEI FENKI I TDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLLPNVNM EPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLSY YYLESQKLSNNVENITLTTSVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKI SDVSVI I PYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTIENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRITTTQFNHINYQMYDLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

78. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWV IPERFSSD TNP SLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERD IGKKLINYL VVGS PFMGDSSTPEDT FDFTRHTTNI AVE
 KFENG SWKVTNI ITPSVL IFGPLPNILDY TASLT LQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFL LTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGF FSQDGP NVQFEELYTFGGLD
 VEI IPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYK KIFSEKYNFDKNTGNFV VNI DK
 FNSLYSDL TNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIY TIR DGFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTASYRKVLGQLSARKLLQDIMS RAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNR LPYVADKDS ISQEI FENKI ITDET NVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLL PNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDY LNSYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKI SDVSVI IPIYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLLEGFP EFTIPALGVFTFYSSI QEREKI IKT IENCLEQRVKRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKN SLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

79. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Glu8_1-29-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWV IPERFSSD TNP SLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERD IGKKLINYL VVGS PFMGDSSTPEDT FDFTRHTTNI AVE
 KFENG SWKVTNI ITPSVL IFGPLPNILDY TASLT LQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFL LTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGF FSQDGP NVQFEELYTFGGLD
 VEI IPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYK KIFSEKYNFDKNTGNFV VNI DK
 FNSLYSDL TNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIY TIR DGFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTESYRKVLGQLSARKLLQDIMS RAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNR LPYVADKDS ISQEI FENKI ITDET NVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLL PNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDY LNSYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKI SDVSVI IPIYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLLEGFP EFTIPALGVFTFYSSI QEREKI IKT IENCLEQRVKRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKN SLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

80. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala15_1-27-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWV IPERFSSD TNP SLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERD IGKKLINYL VVGS PFMGDSSTPEDT FDFTRHTTNI AVE
 KFENG SWKVTNI ITPSVL IFGPLPNILDY TASLT LQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFL LTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGF FSQDGP NVQFEELYTFGGLD
 VEI IPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYK KIFSEKYNFDKNTGNFV VNI DK
 FNSLYSDL TNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIY TIR DGFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGI I TSKTKSDDDDKYADAI FTNSYRKVLAQLSARKLLQDIMALAG
 GGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNR LPYVADKDS ISQEI FENKI ITDET NVQNYSDKFSLDESILDG
 QVPINPEIVDPLL PNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDY LNSYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEEAL
 GYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKI SDVSVI IPIYIGPALNIGNS
 ALRGNFNQAFATAGVAFLLEGFP EFTIPALGVFTFYSSI QEREKI IKT IENCLEQRVKRWKDSYQWMVS
 NWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKN SLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNI
 FSYTNNSLLKDI INEYFN

5

81. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala15-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLS TDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD I GKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGP L PNI LDY T ASLT LQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLT FSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEI I PQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVFNIDK
 FNSLYSDL TNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYPVFANILDDNIYTIRDFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGII TSKTKSDDDDKYADAI FTNSYRKVLAQLSARKLLQDIMSRAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNR L PYVADKDSISQEIFENKIITDET NVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLL PNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYLESQKLSNNVENITLTTSVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTL D KISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKI I KTIENCLEQRVKRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYDSL SYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNM L PKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNN SLLKDI INEYFN

82. Secuencia de proteína de la fusión CP- HS_GHRH_Ala8_Ala15_1-29-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLS TDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD I GKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGP L PNI LDY T ASLT LQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLT FSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEI I PQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVFNIDK
 FNSLYSDL TNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYPVFANILDDNIYTIRDFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGII TSKTKSDDDDKYADAI FTAS YRKVLAQLSARKLLQDIMSRAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNR L PYVADKDSISQEIFENKIITDET NVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLL PNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYLESQKLSNNVENITLTTSVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTL D KISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKI I KTIENCLEQRVKRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYDSL SYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNM L PKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNN SLLKDI INEYFN

5 83. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_9_15_22_27-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLS TDEQKDTFLKGI I KLFKRINERD I GKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFTRHTTNI AVE
 KFENGSWKVTNI I TPSVLI FGP L PNI LDY T ASLT LQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLT FSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEI I PQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKNTGNFVFNIDK
 FNSLYSDL TNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYPVFANILDDNIYTIRDFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGII TSKTKSDDDDKYADAI FTAA YRKVLAQLSARKALQDIASRAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCI KVKNR L PYVADKDSISQEIFENKIITDET NVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLL PNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYLESQKLSNNVENITLTTSVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTL D KISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKI I KTIENCLEQRVKRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYDSL SYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNM L PKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNN SLLKDI INEYFN

84. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_Ala8_9_15_22-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFS SDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLS TDEQKDTFLKGI IKLFRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENG SWKVTNI ITPSVLI FGPLPNILDY TASLT LQGQSNPSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNIN KTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFV VNI DK
 FNSLYSDL TNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIY TIR DGFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSES VVDLFTKVCVDGI I TSKTKS DDDDKYADAI FTAA YRKVLAQLSARKALQDIMS RAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCIKVKNNR LPYVADKDSISQEIFENKIITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLLPVNM EPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLN WANEVVEDFTTNIMKKDTL D KISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTIENCLEQRVKRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

85. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_HVQAL_1-32-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFS SDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLS TDEQKDTFLKGI IKLFRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENG SWKVTNI ITPSVLI FGPLPNILDY TASLT LQGQSNPSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNIN KTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFV VNI DK
 FNSLYSDL TNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIY TIR DGFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSES VVDLFTKVCVDGI I TSKTKS DDDDKHVDAI FTQSYRKVLAQLSARKALQDILSRQQ
 GALAGGGGSGGGGSGGGGSALALQCIKVKNNR LPYVADKDSISQEIFENKIITDETNVQNYSDKFSLDE
 SILDGQVPINPEIVDPLLPVNM EPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTT S
 VEEALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLN WANEVVEDFTTNIMKKDTL D KISDVSVIIPYIGPAL
 NIGNSALRGFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTIENCLEQRVKRWKDSY
 QWMVSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SE
 AMNININKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENT
 MPFNIFSYTNNSLLKDI INEYFN

86. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_HVSAL_1-29-LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFS SDTNPSLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLS TDEQKDTFLKGI IKLFRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENG SWKVTNI ITPSVLI FGPLPNILDY TASLT LQGQSNPSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFSDVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNIN KTI PSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDKDN TGNFV VNI DK
 FNSLYSDL TNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIY TIR DGFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSES VVDLFTKVCVDGI I TSKTKS DDDDKHVDAI FTSSYRKVLAQLSARKLLQDILSRAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCIKVKNNR LPYVADKDSISQEIFENKIITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLLPVNM EPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLN WANEVVEDFTTNIMKKDTL D KISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI I KTIENCLEQRVKRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI ILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

5

87. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_HVTAL_1-29-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNP SLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSKVVTNIITPSVLI FGPLPNILDYASLT LQGQSNPSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFS DVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNIN KTI PSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDN TGNFVVNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIR DGFNLTKNGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGIITSKTKSDDDDKHVDAIF TTSYRKVLAQLSARKLLQDILSRAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCIKVKNNR LPYVADKDSISQEIFENKIITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLN WANEVVEDFTTNIMK KDTLDKISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI IKT IENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYDSL SYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKS QVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHN IILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

88. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_QALN-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNP SLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSKVVTNIITPSVLI FGPLPNILDYASLT LQGQSNPSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFS DVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNIN KTI PSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDN TGNFVVNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIR DGFNLTKNGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGIITSKTKSDDDDKYADAI FTQSYRKVLAQLSARKALQDILNRAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCIKVKNNR LPYVADKDSISQEIFENKIITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLN WANEVVEDFTTNIMK KDTLDKISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI IKT IENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYDSL SYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKS QVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHN IILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

89. Secuencia de proteína de la fusión CP-HS_GHRH_QAL-LHD

TWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNP SLSKPPRPTSKYQS
 YYDPSYLSTDEQKDTFLKGI IKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFDTRHTTNI AVE
 KFENGSKVVTNIITPSVLI FGPLPNILDYASLT LQGQSNPSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFS DVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSSQDGPVQFEELYTFGGLD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNIN KTI PSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDN TGNFVVNIDK
 FNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIR DGFNLTKNGFN IENSGQNI
 ERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDGIITSKTKSDDDDKYADAI FTQSYRKVLAQLSARKALQDILSRAL
 AGGGGSGGGGSGGGGSALALQCIKVKNNR LPYVADKDSISQEIFENKIITDETNVQNYSDKFSLDESIL
 DGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLN SYYYLESQKLSNNVENITLTT SVEE
 ALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKG VQAGLFLN WANEVVEDFTTNIMK KDTLDKISDVSVIIPYIGPALNIG
 NSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTI PALGVFTFYSSI QEREKI IKT IENCLEQRV KRWKDSYQWM
 VSNWLSRIT TQFNHINYQMYDSL SYQADAI KAKIDLEYKKYSGSDKENIKS QVENLKNSLDVKI SEAMN
 NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHN IILVGEVDRLKAKVNESFENTMPF
 NIFSYTNNSLLKDI INEYFN

5

90. Secuencia de proteína de la fusión CP-hGHRH29 N8A M27L -LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNP SLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLS TDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKL INYLVVGS PFMGDSSTPEDT FDFTRHTTNI AVE
 KFENG SWKVTNI I TPSVLI FGPLPNILDY TASLTLQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFS DVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGF FSQDGP NVQFEELYTFGG LD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDK DNTGNFV VNI DK
 FNSLYSDL TNMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIY TIR DGFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSES VVDLFTKVCVDGI I TSKTKSIEGRYADAI FTASYRKVLGQLSARKLLQDILSR
 ALAGGGGSGGGGSGGGGSALALQCIKVKNNR LPYVADKDSISQEI FENKI ITDET NVQNYSDKFSLDES
 ILDGQVPINPEI VDP LLPNVNMEPLNLPGEEIVFYDDITKYVDY LNSYYYLESQKLSN NVENITL TTSV
 EEALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVI IPYIGPALN
 IGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKI I KTIENCLEQRV KRWKDSYQ
 WMVSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAIKAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKN SLDVKI SEA
 MNNINKFIRECSVTYLFKNM LPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI I LVGEVDRLKAKVNESFENTM
 PFNIFSYTNNSLLKDI INEYFN

91. Secuencia de proteína de la fusión CP-hGHRH29 N8A K12N M27L -LHD

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI TTPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNP SLSKPPRPTS KYQS
 YYDPSYLS TDEQKDTFLKGI I KLFKRINERDIGKKL INYLVVGS PFMGDSSTPEDT FDFTRHTTNI AVE
 KFENG SWKVTNI I TPSVLI FGPLPNILDY TASLTLQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFS DVTSN
 QSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINI PSDKRIRPQVSEGF FSQDGP NVQFEELYTFGG LD
 VEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NINKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDK DNTGNFV VNI DK
 FNSLYSDL TNMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIY TIR DGFNL TNKGFNIENSGQNI
 ERNPALQKLSSES VVDLFTKVCVDGI I TSKTKSIEGR YADAI FTASYRNVLGQLSARKLLQDILSR
 ALAGGGGSGGGGSGGGGSALALQCIKVKNNR LPYVADKDSISQEI FENKI ITDET NVQNYSDKFSLDES
 ILDGQVPINPEI VDP LLPNVNMEPLNLPGEEIVFYDDITKYVDY LNSYYYLESQKLSN NVENITL TTSV
 EEALGYSNKIYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVI IPYIGPALN
 IGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKI I KTIENCLEQRV KRWKDSYQ
 WMVSNWLSRIT TQFNHINYQMYD SLSYQADAIKAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKN SLDVKI SEA
 MNNINKFIRECSVTYLFKNM LPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI I LVGEVDRLKAKVNESFENTM
 PFNIFSYTNNSLLKDI INEYFN

5 92. Secuencia de proteína de la fusión N-terminal-hGHRH29 N8A M27L -LHD

HVDAIFTQSYRKVLAQLSARKLLQDILNRNNNNNNNNNTWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRI PQNKLI T
 TPVKAFMITQNIWVI PERFSSDTNP SLSKPPRPTS KYQSYYDPSYLS TDEQKDTFLKGI I KLFKRINER
 DIGKKL INYLVVGS PFMGDSSTPEDT FDFTRHTTNI AVEKFENG SWKVTNI I TPSVLI FGPLPNILDY T
 ASLTLQGQSNPS FEGFGTLS ILKVAPEFLLTFS DVTSNQSSAVLGKSI FCM DPVIALMHELTHSLHQL
 YGINI PSDKRIRPQVSEGF FSQDGP NVQFEELYTFGG LDVEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLN NI
 NKTIPSSWISNIDKYKKI FSEKYNFDK DNTGNFV VNI DKFNSLYSDL TNMSEVVYSSQYNVKNRTHYF
 SRHYLPVFANILDDNIY TIR DGFNL TNKGFNIENSGQNIERNPALQKLSSES VVDLFTKVCVDKSEEKL
 YDDDDKDRWGSS LQCIKVKNNR LPYVADKDSISQEI FENKI ITDET NVQNYSDKFSLDESILDGQVPIN
 PEI VDP LLPNVNMEPLNLPGEEIVFYDDITKYVDY LNSYYYLESQKLSN NVENITL TTSVEEALGYSNK
 IYTF LPSLAEKVNKG VQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVI IPYIGPALNIGNSALRGN
 FNQAFATAGVAFLEGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKI I KTIENCLEQRV KRWKDSYQWMVSNWLSR
 ITTQFNHINYQMYD SLSYQADAIKAKIDLEYKKYSGSDKENI KSQVENLKN SLDVKI SEAMNNINKFIR
 ECSVTYLFKNM LPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNI I LVGEVDRLKAKVNESFENTMPFNIFSYTN
 NSLLKDI INEYFN

93. Proteína de fusión GnRH-C SEQ ID 93

PITINNFNYS DPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKA FRITGNIWWIPDRFSRNSNP NLNKPPRVT
 SPKSGYYDPNYLSTDSKDTFLKEIKLFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFP GNNNTPI NTDFDFDV
 DFNSVDVKTRQGNNWVK TGSINPSVIITGP RENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSIIISP
 RFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILIMHELNHAMHNL YGAI PNDQTISSVTSNIFYSQ
 YNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYYSIAKRLNSIT T ANPSSFNKYIGEYKQK
 LIRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFN YAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDD
 NVYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNL SRNPALRKVNPENMLYLFTKFCVDAIDGRSLYNKTLQ
 CRELLVKNTDL PFIGDISDVKT DIFLRKDINEETEVIYYPDNVSVDQVILSKNTSEHGQLDLLYP
 SIDSESEILPGENQVFYDNRTQNV DYLNSYYLESQKLSDNVEDFTFTR SIEEALDNSAKVYT
 YFPTLANKVNAGVQGGFLMWANDVVEDFTTNILRKDTLDKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRR
 GNFTEAFAVTGV TILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEI IKTIDNCLEQRIKRWKDSYEW M
 MGTWLSRIITQFN NISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKI
 SEAMNNINKFIRECSVTYLFKNM LPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNIILVGEVDK LKAKVN
 NSFQNTIPFNISYTNNSLLKDIINEYFNLEGGGGSGGGGSGGGGSALVMKPIQKLLAGLILLT
 WCVEGCSSQHWSYGLRPGGKRDAENLIDSFQEIVKEVGQLAETQRFECTTHQPRSP LRD LK
 GALES LIEEETGQKKI

94. Fusión de GnRH-D SEQ ID 94

TWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRIPQNK LITTPVKAFMITQNIWWIPERFSSDTNPSLSKPPRPT
 SKYQSYDPSYLSTDEQKDTFLKGIIKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFD
 TRHTTNI AVEKFEENGSWKVTNIITPSVLIFG LPLNILDYASLT LQGQSNPSFEGFGTLSILKV
 APEFLLTFS DVTSNQSSAVL GKSIFCM DPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGGF
 SQDGNVQFEELYTFGG LDVEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNNINKTIPSSWISNIDKYK
 KIFSEKYNFDK DNTGNFVVIDKFN SLYSDLTNMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRH YLPVFA
 NILDDNIYTIRDGFNL TNKGFNIENSGQNIERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEEKLYDDD
 DKDRWGSS LQCIVKNNRLPYVADKDSISQEIFENKIITDETNVQNYSDKFSLDESILDGQVPI
 NPEIVDPLLPNV NMEPLNLPGE EIVFYDDITKYVDYLNSYYLESQKLSNNVENITLTT SVEEA
 LGYSNKIYTF LPSLAEKV NKG VQAGLFLN WANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVIIPYIGPAL
 NIGNSALRGNFNQAFATAGVAFLEGGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKI IKTIENTCLEQRV KR
 WKDSYQWVMVSNWLSRIT TQFNHINYQMYDSL SYQADAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVE
 NLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFKNM LPKVIDELNKFDLRTKTELINLIDSHNIILVGE
 VDRLKAKVNESFENTMPFNISYTNNSLLKDIINEYFNLEGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSA
 LVMKPIQKLLAGLILLTWCVEG CSSQHWSYGLRPGGKRDAENLIDSFQEIVKEVGQLAETQR
 FECTTHQPRSP LRD LKGALES LIEEETGQKKI

Ejemplo 1: Preparación de una construcción de cadena principal de LH_N/A

- 5 El siguiente procedimiento crea un clon para uso como cadena principal de expresión para la expresión multidominio de proteínas. Este ejemplo se basa en la preparación de un clon basado en serotipo A (SEQ ID 1), aunque los procedimientos y métodos son igualmente aplicables a todos los serotipos LH_N tal como el serotipo B (SEQ ID 12), el serotipo C (SEQ ID 3) y el serotipo D (SEQ ID 4) y otros dominios de proteasa o de traslocalización tales como IgA y H_N de tétanos usando la secuencia publicada apropiada para la síntesis (SEQ ID 32).

10 **Preparación de vectores de clonación y de expresión**

- 15 Se elige el pCR4 (Invitrogen) como vector de clonación estándar debido a la falta de secuencias de restricción dentro del vector y a los sitios de cebador de secuenciación adyacentes para una fácil confirmación de construcción. El vector de expresión se basa en el vector de expresión pET (Novagen) que ha sido modificado para contener el sitio de clonación múltiple *NdeI-BamHI-SalI-PstI-XbaI-HindIII* para la inserción de la construcción, se ha eliminado un fragmento del vector de expresión para crear un plásmido no movilizable, se ha insertado una variedad de etiquetas de fusión diferentes para aumentar las opciones de purificación y se ha eliminado un sitio *XbaI* existente en la cadena principal del vector para simplificar la sub-clonación.

Preparación de LC/A

La secuencia de ADN se diseña mediante traducción inversa de la secuencia de aminoácidos LC/A (obtenida de fuentes de bases de datos disponibles libremente, tales como GenBank (número de acceso P10485) usando una
 5 v2.0 (Entelechon)). Se incorporan secuencias de reconocimiento *Bam*HI/*Sal*I en los extremos 5' y 3', respectivamente, de la secuencia manteniendo el marco de lectura correcto. Se realiza un escrutinio de la secuencia de ADN (usando un software tal como el SeqBuilder, DNASTAR Inc.) para determinar las secuencias de ruptura de
 10 enzima de restricción incorporadas durante la traducción inversa. Cualquier secuencia de ruptura que se observe que es común a las requeridas por el sistema de clonación es eliminada mediante la herramienta Backtranslation de la secuencia codificadora propuesta, asegurando que se mantiene un uso de codón de *E. coli* común. El uso de
 15 codón de *E. coli* se determina mediante programas de software tales como "Graphical Codon Usage Analyser" (Geneart), y se determina el % GC y la ratio de uso de codón usando como referencia tablas de uso de codón publicadas (por ejemplo, GenBank Release 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada que contiene el marco de lectura abierto (ORF) LC/A es sintetizada entonces comercialmente (por ejemplo, por Entelechon, Geneart o Sigma-Genosys) y se proporciona en el vector pCR4.

Preparación de injerto H_N/A

La secuencia de ADN se diseña mediante traducción inversa de la secuencia de aminoácidos H_N/A (obtenida de fuentes de bases de datos disponibles libremente, tales como GenBank (número de acceso P10845) usando una
 20 entre una variedad de herramientas de software de traducción inversa (por ejemplo, la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)). Se incorpora una secuencia de restricción *Pst*I en el extremo N y *Xba*I-codón de parada-HindIII en el extremo C, asegurando que se mantiene el marco de lectura correcto. Se realiza un escrutinio de la secuencia de ADN (usando un software tal como el SeqBuilder, DNASTAR Inc.) para determinar las secuencias de ruptura de
 25 enzima de restricción incorporadas durante la traducción inversa. Cualquier secuencia de ruptura que se observe que es común a las requeridas por el sistema de clonación es eliminada mediante la herramienta Backtranslation de la secuencia codificadora propuesta, asegurando que se mantiene un uso de codón de *E. coli* común. El uso de
 30 codón de *E. coli* se determina mediante programas de software tales como "Graphical Codon Usage Analyser" (Geneart), y se determina el % GC y la ratio de uso de codón usando como referencia tablas de uso de codón publicadas (por ejemplo, GenBank Release 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada es sintetizada entonces comercialmente (por ejemplo, por Entelechon, Geneart o Sigma-Genosys) y se proporciona en el vector pCR4.

Preparación del interdominio (ligando LC-H_N)

El ligando LC-H_N puede diseñarse a partir del primer principio, usando la información de secuencia existente para el
 35 ligando como plantilla. Por ejemplo, el ligando de serotipo A (en este caso definido como región de polipéptido interdominio que existe entre las cisteínas del puente disulfuro entre LC y H_N) tiene la secuencia VRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDL. Esta información de secuencia se encuentra disponible libremente en fuentes de bases de datos tales como GenBank (número de acceso P10845). Para la generación de un sitio de ruptura de
 40 proteasa específico, se puede usar la secuencia de reconocimiento nativa para el Factor Xa en la secuencia modificada VDGIIITSKTKSLIEGR o se inserta una secuencia de reconocimiento de enteroquinasa en el bucle de activación para generar la secuencia VDGIIITSKTKSDDDDKNKALNLQ. Usando una entre una variedad de
 45 herramientas de software de traducción inversa (por ejemplo, la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)) se determina la secuencia de ADN que codifica la región ligando. Se incorporan secuencias de enzima de restricción *Bam*HI/*Sal*I y *Pst*I/*Xba*I/codón de parada/HindIII en cualquier extremo, en los marcos de lectura correctos. Se realiza un escrutinio de la secuencia de ADN (usando un software tal como el SeqBuilder, DNASTAR Inc.) para determinar
 50 las secuencias de ruptura de enzima de restricción incorporadas durante la traducción inversa. Cualquier secuencia de ruptura que se observe que es común a las requeridas por el sistema de clonación es eliminada mediante la herramienta Backtranslation de la secuencia codificadora propuesta, asegurando que se mantiene un uso de codón de *E. coli* común. El uso de codón de *E. coli* se determina mediante programas de software tales como "Graphical Codon Usage Analyser" (Geneart), y se determina el % GC y la ratio de uso de codón usando como referencia
 55 tablas de uso de codón publicadas (por ejemplo, GenBank Release 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada es sintetizada entonces comercialmente (por ejemplo, por Entelechon, Geneart o Sigma-Genosys) y se proporciona en el vector pCR4.

Ensamblaje y confirmación del clon de cadena principal

Debido al tamaño pequeño, el ligando de activación debe transferirse usando un proceso de dos etapas. El vector
 55 ligando pCR-4 es dividido con una combinación de enzimas de restricción *Bam*HI + *Sal*I y el vector dividido a continuación actúa como receptor del ADN de LC dividido mediante enzimas de restricción *Bam*HI + *Sal*I. Una vez que el ADN que codifica LC es insertado por encima del ADN ligando, el fragmento de ADN de ligando-LC puede aislarse a continuación y transferirse al vector de expresión pET MCS. El ligando-LC es cortado del vector de clonación pCR4 usando digestos de enzimas de restricción *Bam*HI/*Pst*fl. El vector de expresión pET es digerido con
 60 las mismas enzimas pero también es tratado con fosfatasa antártica como precaución adicional para prevenir la recircularización. El ligando-LC y la cadena principal de vector pET son purificadas en gel y el inserto purificado y la

cadena principal purificada son ligados usando ligadas de ADN T4. El producto es transformado con células TOP10 que son sometidas a escrutinio a continuación para determinar ligando-LC usando digestión de restricción *Bam*HI/*Pst*I. A continuación se repite el proceso para la inserción de H_N en los sitios de restricción *Pst*I/*Hind*III de la construcción pET-ligando-LC. El escrutinio con enzimas de restricción es suficiente para asegurar que la cadena principal final es correcta, ya que todos los componentes ya están secuenciados y confirmados durante la síntesis. Sin embargo, durante la sub-clonación de algunos componentes en la cadena principal, donde fragmentos de tamaño similar están siendo eliminados e insertados, se requiere el secuenciamiento de una región pequeña para confirmar la inserción correcta.

Ejemplo 2: Construcción de LH_N/AA-CP-GS15-SST28

El siguiente procedimiento crea un clon para uso como construcción de expresión para la expresión de fusión multidominio en la que el resto dirigido a diana (TM) es presentado centralmente entre la proteasa y el dominio de traslocalización. Este ejemplo se basa en la preparación de la fusión LH_N/A-CP-GS15-SST28 (SEQ ID 25), aunque los procedimientos y los métodos son igualmente aplicables para la creación de otras fusiones de proteasa, traslocalización y TM, en donde el TM es N-terminal respecto al dominio de traslocalización. En este ejemplo, se diseña un espaciador glicina-serina flanqueante de 15 aminoácidos (G₄S) en la secuencia interdominio para asegurar la accesibilidad del ligando a su receptor, pero también son aplicables otros espaciadores.

Preparación de injerto espaciador-SST28 humano

La región ligando de polipéptido inter-dominio LC-H_N existe entre las cisteínas del enlace disulfuro entre LC y H_N. Para la inserción de un sitio de ruptura de proteasa, de un espaciador y de una región de resto dirigido a diana (TM) en el bucle de activación, se usa una de entre una variedad de herramientas de software de traducción inversa (por ejemplo, la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon) para determinar la secuencia de ADN que codifica la región ligando. Para la presentación central de una secuencia de SST28 en el extremo N del dominio H_N, se diseña una secuencia de ADN para las regiones de espaciador GS y de resto dirigido a diana (TM) que permite la incorporación en el clon de cadena principal (SEQ ID 1). La secuencia de ADN se puede disponer como *Bam*HI-*Sa*II-espaciador-sitio de activación de proteasa-SST28-espaciador-*Pst*I-*Xba*I-codón de parada-*Hind*III (SEQ ID 5). Una vez diseñado el ADN de TM, el ADN adicional requerido para codificar el espaciador preferido es creado *in silico*. Es importante asegurar que se mantiene el marco de lectura correcto para el espaciador, SST28 y las secuencias de restricción y que la secuencia *Xba*I no viene precedida por las bases TC, lo que daría como resultado la metilación DAM. La secuencia de ADN es sometida a escrutinio para determinar la secuencia de restricción incorporada, y cualesquier otros sitios adicionales son eliminados manualmente de la secuencia asegurando que se mantiene un uso de codón de *E. coli* común. El uso de codón de *E. coli* se determina mediante programas de software tales como "Graphical Codon Usage Analyser" (Geneart), y se determina el % GC y la ratio de uso de codón usando como referencia tablas de uso de codón publicadas (por ejemplo, GenBank Release 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada es sintetizada entonces comercialmente (por ejemplo, por Entelechon, Geneart o Sigma-Genosys) y se proporciona en el vector pCR4.

Ensamblaje y confirmación del clon de cadena principal

A fin de crear una construcción de LC-espaciador-sitio de activación-SST28-espaciador-H_N (SEQ ID 25) usando la construcción de cadena principal (SEQ ID 1) y el recién sintetizado vector pCR 4-espaciador-sitio de activación-TM-espaciador que codifica el TM SST28 (SEQ ID 5), se puede usar un método de una o dos etapas; típicamente se usa el método de dos etapas cuando el ADN del TM tiene menos de 100 pares base. Usando el método de una etapa, la región de ligando SST28 se puede insertar directamente en la construcción de cadena principal cortando el vector pCR4-espaciador-sitio de activación-TM-espaciador con enzimas de restricción *Sa*II y *Pst*I e insertando el fragmento de ADN que codifica TM en una construcción de cadena principal de pET cortada de forma similar. Usando el método de dos etapas, el dominio LC es escindido del clon de cadena principal usando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sa*II, y es ligado en un vector pCR 4-espaciador-sitio de activación-TM-espaciador digerido de forma similar. Esto crea un ORF LC-espaciador-sitio de activación-SST28-espaciador en pCR 4 que puede ser escindido del vector usando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I para posterior ligación en una construcción de expresión pET cortada de forma similar. La construcción final contiene el ADN de LC-espaciador-sitio de activación-SST28-espaciador-H_N (SEQ ID 25) que dará como resultado una proteína de fusión que contiene la secuencia ilustrada en SEQ ID 26.

Ejemplo 3: Expresión y purificación de una proteína de fusión LH_N/A-CP-SST28

Este ejemplo se basa en la preparación de una proteína LH_N/A que incorpora un polipéptido de TM de SST28 en la región ligando interdominio (SEQ ID 26), donde el ORF del vector de expresión pET también codifica una etiqueta de purificación de histidina. Estos procedimientos y métodos son aplicables igualmente a otras proteínas de fusión, tal como las mostradas en SEQ ID 7-14, 42-48, 57, 60-91. Cuando es apropiado, la enzima de activación debería ser seleccionada para ser compatible con el sitio de activación de proteasa de cada secuencia.

Expresión de LH_N/A-CP-SST28

La expresión de la proteína LH_N/A-CP-SST28 se logra usando el siguiente protocolo. Inocular 100 mL de TB modificado que contiene 0,2% de glucosamina y 30 µg/mL de canamicina en un matraz de 250 mL con una única colonia de la cepa de expresión de LHA-CP-SST28. Desarrollar el cultivo a 37°C, 225 rpm durante 16 horas. Inocular 1 L de TB modificado que contiene 0,2 % de glucosamina y 30 µg/mL de canamicina en un matraz de 2 L con 10 mL de cultivo de una noche. Desarrollar los cultivos a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ nm de aproximadamente 0,5, momento en el cual se reduce la temperatura a 16°C. Después de 1 hora, inducir los cultivos con IPTG 1 mM y cultivar a 16°C durante otras 16 horas.

Purificación de la proteína LH_N/A-CP-SST28

Descongelar un tubo falcon que contiene 35 mL de HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 200 mM y aproximadamente 10 g de pasta celular de *E. coli* BL21 (DE3). Homogeneizar la pasta celular (1,38 bar, 20 psi) asegurando que la muestra permanece fría. Hacer girar las células lisadas a 18 000 rpm, 4°C durante 30 minutos. Cargar el sobrenadante en una columna Quelante cargada de NisO₄ 0,1 M (20-30 mL de columna son suficientes) equilibrada con HEPES 50 mM, pH 7,2, NaCl 200 mM. Usando un gradiente por etapas de imidazol 10, 40 y 100 mM, eliminar por lavado la proteína ligada no específica y eluir la proteína de fusión con imidazol 200 mM. La proteína de fusión eluida se dializa contra 5 L de HEPES 50 mM, pH 7,2, NaCl 200 mM a 4°C durante una noche, y se mide la DO₂₈₀ nm para establecer la concentración de proteína. Añadir 3,2 µL de enteroquinasa (New England Biolabs) por mg de proteína de fusión e incubar en condiciones estáticas durante una noche a 25°C. Cargar en una columna Quelante cargada de NisO₄ 0,1 M (20-30 mL de columna son suficientes) equilibrada con HEPES 50 mM, pH 7,2, NaCl 200 mM. Lavar la columna hasta línea base con HEPES 50 mM, pH 7,2, NaCl 200 mM. Usando un gradiente por etapas de imidazol 10, 40 y 100 mM, eliminar por lavado la proteína ligada no específica y eluir la proteína de fusión con imidazol 200 mM. Dializar la proteína de fusión eluida contra 5L de HEPES 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM a 4°C durante una noche y concentrar la fusión hasta aproximadamente 2 mg/mL, tomar una alícuota de muestra y congelar a -20°C. Evaluar la proteína purificada usando DO₂₈₀, BCA y análisis de pureza.

Ejemplo 4: Construcción de LH_N/D-CT-GS20-CST28

El siguiente procedimiento crea un clon para uso como construcción de expresión para la expresión de fusión multidominio en la que el resto dirigido a diana (TM) es presentado C-terminalmente al dominio de traslocalización. Este ejemplo se basa en la preparación de la fusión LH_N/D-CT-GS20-CST28 (SEQ ID 17), aunque los procedimientos y los métodos son igualmente aplicables para crear otras fusiones de proteasa, traslocalización y TM, en donde el TM es C-terminal respecto al dominio de traslocalización. En este ejemplo, se diseña un espaciador flanqueante de glicina-serina de 20 aminoácidos en la secuencia interdominio para asegurar la accesibilidad del ligando a su receptor, pero también son aplicables otros espaciadores.

Preparación de injerto de espaciador-CST28 humano

Para la presentación de una secuencia CST28 en el extremo C del dominio HN, se diseña una secuencia de ADN para que flanquee a las regiones del espaciador y del resto dirigido a diana (TM), permitiendo la incorporación en el clon de cadena principal (SEQ ID N4). La secuencia de ADN puede disponerse como *Bam*HI-*Sall*-*Pst*I-*Xba*I-espaciador-CST28-codón de parada-*Hind*III (SEQ ID 6). La secuencia de ADN se puede diseñar usando una entre una variedad de herramientas de software de traducción (por ejemplo, EditSeq proporciona la mejor traducción inversa de *E. coli* (DNASTAR Inc.), o la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)). Una vez diseñado el ADN del TM, el ADN adicional requerido para codificar el espaciador preferido es creado *in silico*. Es importante asegurar que se mantiene el marco de lectura correcto para el espaciador, CST28 y las secuencias de restricción y que la secuencia *Xba*I no viene precedida por las bases TC, lo que daría como resultado una metilación DAM. La secuencia de ADN es sometida a escrutinio en términos de secuencias de restricción incorporadas y se eliminan cualesquier secuencias adicionales manualmente de la secuencia remanente, asegurando que se mantiene un uso de codón de *E. coli* común. El uso de codón de *E. coli* se determina en referencia a programas de software tales como "Graphical Codon Usage Analyser (Geneart)", y se determina el contenido de GC% y la ratio de uso de codón en referencia a tablas de uso de codón publicadas (por ejemplo, GenBank Release 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada es sintetizada a continuación comercialmente (por ejemplo, por Entelechon, Geneart o Sigma-Genosys) y se proporciona en el vector pCR 4.

Ensamblaje y confirmación del clon de cadena principal

A fin de crear una construcción LH_N/D-GS20-CST28 (SEQ ID 17) usando la construcción de cadena principal (SEQ ID 4) y el recién sintetizado vector pCR 4-espaciador-TM que codifica el TM CST28 (SEQ ID 6), se puede usar un método de una o dos etapas; típicamente se usa el método de dos etapas cuando el ADN del TM tiene menos de 100 pares base. Usando el método de una etapa, el CST28 se puede insertar directamente en la construcción de cadena principal cortando el vector pCR4-espaciador-TM con enzimas de restricción *Xba*I y *Hind*III e insertando el fragmento de ADN que codifica TM en una construcción de cadena principal de pET cortada de forma similar. Usando el método de dos etapas, el dominio LH_N es escindido del clon de cadena principal usando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I, y es ligado en un vector pCR 4-espaciador-CST28 digerido de forma similar. Esto crea un

ORF LH_N-espaciador-CST28 en pCR 4 que puede ser escindido del vector usando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III para posterior ligación en una construcción de expresión pET cortada de forma similar. La construcción final contiene el ADN de LC-ligando-H_N-espaciador-CST28 (SEQ ID 17) que dará como resultado una proteína de fusión que contiene la secuencia ilustrada en SEQ ID 18.

5 **Ejemplo 5: Expresión y purificación de una proteína de fusión LH_N/D-CT-CST28**

Este ejemplo se basa en la preparación de una proteína LH_N/D que incorpora un polipéptido de TM CST28 en el extremo carboxilo del dominio H_N (SEQ ID 18), donde el ORF del vector de expresión pET también codifica una etiqueta de purificación de histidina. Estos procedimientos y métodos son igualmente aplicables a secuencias de proteínas de fusión tales como las mostradas en las SEQ ID 15, 16, 18-24, 27-31, 33-41, 58-59 y 93-94. Cuando sea apropiado, la enzima de activación debería seleccionarse para ser compatible con el sitio de activación de proteasa de cada secuencia.

Expresión de LH_N/D-CT-CST28

La expresión de la proteína LH_N/D-CT-CST28 se consigue usando el siguiente protocolo. Inocular 100 mL de TB modificado que contiene un 0,2% de glucosamina y 30 µg/mL de canamicina en un matraz de 250 mL con una única colonia de la cepa de expresión de LH_N/D-CT-CST28. Desarrollar el cultivo a 37°C, 225 rpm durante 16 horas. Inocular 1 L de TB modificado que contiene un 0,2% de glucosamina y 30 µg/ml de canamicina en un matraz de 2 L con 10 mL de cultivo de una noche. Desarrollar los cultivos a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ nm aproximada de 0,5, punto en el cual se reduce la temperatura hasta 16°C. Después de 1 hora, inducir los cultivos con IPTG 1 mM y cultivar a 16°C durante otras 16 horas.

Purificación de la proteína LH_N/D-CT-CST28

Descongelar un tubo falcon que contiene 35 mL de HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 200 mM y aproximadamente 10 g de pasta celular de *E. coli* BL21 (DE3). Homogeneizar la pasta celular (1,38 bar, 20 psi) asegurando que la muestra permanece fría. Hacer girar las células lisadas a 18 000 rpm, 4°C durante 30 minutos. Cargar el sobrenadante en una columna Quelante cargada de NisO₄ 0,1 M (20-30 mL de columna son suficientes) equilibrada con HEPES 50 mM, pH 7,2, NaCl 200 mM. Usando un gradiente por etapas de imidazol 10, 40 y 100 mM, eliminar por lavado la proteína ligada no específica y eluir la proteína de fusión con imidazol 200 mM. La proteína de fusión eluida se dializa contra 5 L de HEPES 50 mM, pH 7,2, NaCl 200 mM a 4°C durante una noche, y se mide la DO₂₈₀ nm para establecer la concentración de proteína. Añadir 3,2 µL de enteroquinasa (New England Biolabs) por mg de proteína de fusión e incubar en condiciones estáticas durante una noche a 25°C. Cargar en una columna Quelante cargada de NisO₄ 0,1 M (20-30 mL de columna son suficientes) equilibrada con HEPES 50 mM, pH 7,2, NaCl 200 mM. Lavar la columna hasta línea base con HEPES 50 mM, pH 7,2, NaCl 200 mM. Usando un gradiente por etapas de imidazol 10, 40 y 100 mM, eliminar por lavado la proteína ligada no específica y eluir la proteína de fusión con imidazol 200 mM. Dializar la proteína de fusión eluida contra 5L de HEPES 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM a 4°C durante una noche y concentrar la fusión hasta aproximadamente 2 mg/mL, tomar una alícuota de muestra y congelar a -20°C. Evaluar la proteína purificada usando DO₂₈₀, BCA y análisis de pureza. Las Figuras 1 y 2 demuestran la purificación de las proteínas de fusión analizadas mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 6: Conjugación química de LH_N/A a TM de SST

El siguiente procedimiento crea una molécula conjugada químicamente que contiene la secuencia de aminoácidos LH_N/A (SEQ ID 49), preparada a partir de la SEQ ID 1 usando el método de producción descrito en el ejemplo 3, y un péptido de octreotide SST que ha sido sintetizado químicamente (SEQ ID 54). Sin embargo, los procedimientos y los métodos son igualmente aplicables para la conjugación de otros péptidos tales como SEQ ID 55 y SEQ ID 56 a las proteínas de dominio de proteasa/traslocalización tales como las que contienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID 50, 51, 52 y 53.

La proteína LH_N/A fue cambiada de disolución tampón, de Hepes 50 mM sal 150 mM a PBSE (Na₂HPO₄ 100 mM, 14,2 g; NaCl 100 mM, 5,85 g; EDTANa₂ 1 mM, pH 7,5 con HCl 1 M) usando la columna Bio-rad PD10. Esto se realizó lavando un volumen de columna de PBSE a través de la columna PD10, a continuación se añadió la proteína a la columna hasta que no quedaran más gotas al final de la columna PD10. Entonces se añadieron 8 mL de PBSE y se toman fracciones de 0,5 mL. Las fracciones recolectadas son medidas usando lecturas A₂₈₀ y las fracciones que contienen la proteína son agrupadas. Se obtuvo una concentración de 1,55 mg/mL de LH_N/A en la etapa de intercambio de disolución tampón, y ésta se usó para fijar las siguientes reacciones:

LH _N /A 1,55 mg/mL	SPDP o Sulfo-LC-SPDP 20 mM
A 200 µL	0
B 200 µL	Aumento de 400% 0,62 µL
C 200 µL	Aumento de 800% 1,24 µL

Las muestras se dejaron tumbadas a temperatura ambiente durante 3 horas antes de ser llevadas a otra columna PD10 para cambiar el tampón a PBSE y de que las fracciones que contenían la proteína fueran agrupadas. A continuación se añadió una concentración final de DTT de 25 mM a la proteína derivatizada y después las muestras fueron dejadas a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se tomaron entonces lecturas de A₂₈₀ y A₃₄₃ para procesar la ratio de la interacción SPDP:LH_N/A, y la reacción que dio como resultado una relación de derivatización de entre 1 y 3 se usó para la conjugación de péptido. El reactivo SPDP se une a las aminas primarias de LH_N/A a través de un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), dejando la porción de sulfhidrilo reactivo para formar un enlace disulfuro con el grupo SH libre de la cisteína libre del péptido sintetizado. En este caso, la secuencia de péptido es Octreotide, que ha sido sintetizado con una cisteína libre en el extremo N (SEQ ID 91). El LH_N/A derivatizado con SPDP fue mezclado con un exceso 4 a 1 del ligando de Octreotide y después se dejó la reacción a temperatura ambiente durante 90 minutos con agitación. El octreotide de exceso fue eliminado a continuación usando una columna PD10 dando lugar a la molécula conjugada de LH_N/A-Octreotide.

15 **Ejemplo 7: Actividad de SST-LH_N/A en células neuroendocrinas cultivadas (AtT20)**

La línea de células de tumor de pituitaria de rata AtT20 es un ejemplo de línea celular de origen endocrino. Por tanto, representa un modelo de línea celular para la investigación de los efectos de inhibición-de-liberación de los agentes.

Las células AtT20 poseen receptores superficiales que permiten la unión, y la internalización, de SST-LH_N/A. Por el contrario, las células AtT20 carecen de receptores adecuados para neurotoxinas clostridiales y por lo tanto no son susceptibles a neurotoxinas botulínicas (BoNTs).

La Figura 3 (a) ilustra la inhibición de la liberación de ACTH desde células AtT20 después de una incubación previa con SST-LH_N/A. Es evidente que se produce una inhibición dependiente de la dosis, lo que indica que el SST-LH_N/A puede inhibir la liberación de ACTH desde un modelo de célula endocrina. Se demostró que la inhibición de la liberación de ACTH se correlaciona con la ruptura de la proteína SNARE SNAP25 (Figura 3 (a) y (b)). De esta manera, la inhibición de la liberación del mensajero químico es debida a un efecto mediado por endopeptidasa clostridial de la ruptura de proteína SNARE.

Materiales y métodos

Los kits de inmunoensayo de enzima ACTH se obtuvieron en Bachem Research Inc., CA, EE.UU. Los reactivos para el ensayo de transferencia Western se obtuvieron en Invitrogen y Sigma. Las células AtT20 fueron sembradas en placas de 12 pocillos y se cultivaron en DMEM que contenía un 10% de suero bovino fetal, Glutamax 4 mM. Después de 1 día se aplicó SST-LH_N/A durante 72 horas y después las células fueron lavadas para eliminar el SST-LH_N/A no ligado. La secreción de ACTH fue estimulada elevando la concentración de potasio extracelular (KCl 60 mM) y de calcio extracelular (CaCl₂ 5 mM) durante 30 minutos. Se recolectó el medio de las células y se almacenó a -20°C hasta la determinación del contenido de ACTH usando el kit de inmunoensayo y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron solubilizadas en tampón de muestreo reductor de electroforesis 1x LDS, calentadas durante 10 minutos a 90°C y después almacenadas a -20°C hasta ser usadas para el ensayo de transferencia Western. La secreción estimulada se calculó restando la liberación basal de la liberación total en condiciones de estimulación. Las muestras celulares solubilizadas fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La proteólisis de SNAP-25, un componente crucial del proceso neurosecretor y el sustrato para la actividad de endopeptidasa dependiente de cinc de BoNT/A, fue detectada a continuación sondeando con un anticuerpo que reconozca tanto la forma intacta como la dividida de la SNAP-25. La cuantificación de la proteólisis se realizó mediante análisis de imagen usando el sistema de imagen Synoptics Syngene GeneGnome y el software GeneTools.

Ejemplo 8: Actividad de SST-LH_N/D en células neuroendocrinas cultivadas (GH3)

La línea celular de pituitaria de rata GH3 es un ejemplo de línea celular de origen neuroendocrino. Por tanto, representa una línea celular modelo para la investigación de los efectos de inhibición-de-liberación de los agentes.

Las células GH3 poseen receptores superficiales que permiten la unión, y la internalización de SST-LH_N/D. Por el contrario, las células GH3 carecen de receptores adecuados para neurotoxinas clostridiales y por lo tanto no son susceptibles a las neurotoxinas botulínicas (BoNTs).

5 La Figura 4 ilustra la inhibición de la liberación de hormona de crecimiento (GH) desde células GH3 antes de la incubación con SST-LH_N/D. Es evidente que se observa una inhibición dependiente de la dosis, que indica que el SST-LH_N/D puede inhibir la liberación de GH desde un modelo de célula neuroendocrina.

La comparación de los efectos de inhibición observados con el conjugado y el LH_N/D no atacado demuestran la contribución del resto dirigido a diana (TM) en la inhibición eficiente de la liberación de transmisor.

Materiales y métodos

10 Los kits de inmunoensayo de enzima GH fueron obtenidos en Millipore, MA, EE.UU. Las células GH3 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos en mezcla de nutrientes F-10 (Ham) suplementada con un 15% de suero equino, 2,5% de FBS, L-glutamina 2 mM. Las células fueron tratadas con SST-LH_N/D o LH_N/D durante 72 horas, después fueron lavadas para eliminar el SST-LH_N/D no ligado. La secreción se estimuló exponiendo las células a tetradecanoil forbol acetato (TPA, PMA) 10 μM durante 30 minutos. Se recolectó el medio de las células y se almacenó a -20°C hasta evaluación del contenido de GH usando el kit de inmunoensayo y siguiendo las instrucciones del fabricante. La secreción estimulada se calculó restando la liberación basal de la liberación total en condiciones de estimulación.

Ejemplo 9: Método para aliviar síntomas acromegálicos reduciendo los niveles elevados de GH e IGF-1 consecuencia de un adenoma pituitario

20 Un miembro de 35 años de edad de un equipo masculino de bádminton es sometido a un examen de rayos-X espinal por un dolor de espalda. El personal que le atiende detecta un crecimiento óseo anormal y, tras preguntar, el hombre informa de incidentes crecientes de apnea del sueño y también de un aumento del contenido graso de la piel.

25 El médico recomienda la medición de la IGF-1 en circulación y se observa que los niveles son elevados. Ensayos posteriores también muestran niveles de GH en circulación por encima de lo normal, por lo que se realiza un escáner de IRM. Éste muestra un tumor pituitario de 9 mm de diámetro. El paciente es tratado con una proteína de fusión de TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31) mediante inyección i.v.

30 A intervalos de 1 semana se mide el nivel de IGF-1 en circulación y se observa que es inferior a la primera medida y que se reduce constantemente hasta un 15% por encima de lo normal a lo largo de las siguientes seis semanas. Se observa que el nivel de GH en circulación es normal en ese momento. Una dosis adicional de la medicación con mediciones del nivel de IGF-1 quincenales demuestra que dicha hormona se ha estabilizado en el nivel superior del intervalo normal. A las seis semanas del segundo tratamiento, un escáner de IRM craneal revela una reducción del tumor hasta los 6 mm. Se continúa con la terapia en dosis reducidas en intervalos bimensuales, midiendo los niveles de IGF-1 y GH a la séptima semana. Ambos resultan estables en el rango normal y la apnea del sueño y la piel aceitosa han desaparecido. Un examen de rayos-X espinal un año después del primer tratamiento demuestra que no hay ningún aumento de tamaño óseo desde la observación original.

Ejemplo 10: Método para normalizar dedos hirsutos hinchados reduciendo niveles elevados de GH e IGF-1 consecuencia de un adenoma pituitario

40 Una trabajadora de pastelería de 50 años de edad presenta una dificultad creciente para quitarse su anillo de boda y finalmente visita a su médico de familia. El médico también detecta que los dedos de la paciente tienen más vello de lo esperado y, tras ser preguntada, la paciente admite que ambas condiciones han aparecido gradualmente. Ensayos clínicos posteriores revelan un nivel por encima de la media de GH en circulación que no cambia tras ingerir una bebida rica en glucosa. Se sospecha la presencia de una afección acromegálica y un escáner CT craneal confirma la presencia de un pequeño tumor pituitario.

45 La cirugía es considerada inapropiada por lo que el paciente es tratado con una inyección i.v. de una proteína de fusión de TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31). Después de cuatro semanas el ensayo de tolerancia de glucosa muestra que la respuesta en los niveles de GH y en los niveles de IGF-1 es próxima a lo normal. El tratamiento es continuado en intervalos de seis semanas y al final de la decimotava semana la paciente es capaz de quitarse el anillo fácilmente y el hirsutismo ha desaparecido.

Ejemplo 11: Método para aliviar las consecuencias de un adenoma pituitario secretor de hormona de crecimiento re-emergente

50 Un hombre buzo de 52 años de edad se presenta con síntomas acromegálicos cada vez más destacados, que incluyen hinchamiento de tejidos blandos y agrandamiento de las extremidades. Unas pruebas exhaustivas confirman la presencia de un adenoma pituitario de 12 mm. El paciente tolera mal los análogos de somatostatina, por lo que el tumor es reseccionado y pruebas regulares a lo largo de 2 años muestran que los niveles de GH y de

IGF-1 se encuentran en el rango superior de lo normal y no se administra ninguna medicación adicional. Dieciocho meses después, tras presentarse con hiperhidrosis e hipertensión moderada, se observa que los niveles de GH y de IGF-1 están por encima de lo normal y un escáner CT revela un recrecimiento del adenoma pituitario. Una resección repetida se considera no deseada.

- 5 El hombre es tratado mediante administración i.v. de una proteína de fusión de TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31). También se administra un curso de radioterapia y después de cuatro semanas la hiperhidrosis y la hipertensión están cerca de lo normal, al igual que los niveles de GH y de IGF-1. A lo largo de los tres años siguientes los síntomas no muestran recurrencia y no hay recrecimiento tumoral después de cinco años del tratamiento.

10 **Ejemplo 12: Método para tratar pacientes acromegálicos resistentes a análogos de somatostatina**

Después de seis años de control con éxito de los niveles de GH y de IGF-1 en circulación mediante análogos de somatostatina, una lectora de tarot de feria acromegálica de 60 años de edad informa de un evidente aumento de piel aceitosa y de un olor corporal prominente como resultado de hiperhidrosis. Se observa que es intolerante a la glucosa y que presenta niveles elevados de IGF-1 en circulación y la elevación de la dosis de SSA no los controla.

- 15 Es tratada mediante inyección localizada de una proteína de fusión de TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31). A los 14 días la paciente informa de una reducción significativa de la sudoración. A lo largo del siguiente mes su piel aceitosa vuelve a la normalidad y en ese momento sus niveles de GH y de IGF-1 se hayan ambos dentro del rango normal. Esta situación se mantiene durante los siguientes cinco años.

20 **Ejemplo 13: Método para tratar la enfermedad de Cushing en pacientes intolerantes a análogos de somatostatina**

- Una estudiante de 30 años de edad visita a su médico general para solicitar tratamiento para la ansiedad y la depresión. El médico observa que la mujer tiene una cara redondeada con un aumento de grasa en el cuello y también brazos y piernas más delgados de lo normal. Tras preguntar, ella confirma un ciclo menstrual irregular. Se mide un nivel de cortisol urinario libre de 24-horas de 150 µg, lo que sugiere un síndrome de Cushing. Un escáner de IRM abdominal no muestra tumores adrenales presentes, aunque un escáner de IRM craneal revela un pequeño tumor pituitario.

La paciente se considera inadecuada para intervención quirúrgica por lo que es tratada con una proteína de fusión de TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31).

Ejemplo 14: Método para revertir la impotencia sexual femenina a través del tratamiento de prolactinoma

- 30 Una mujer de 36 años de edad visita a su doctor, preocupada por una reciente expresión de leche materna, a pesar de presentar un negativo en la prueba de embarazo. Un examen también indica sequedad vaginal y ella confirma que ha perdido la libido. Los resultados de las pruebas clínicas son normales en general con la excepción notable de una moderada hiperprolactinemia. Un escáner de IRM craneal indica un adenoma pituitario, consistente con los niveles elevados de prolactina.

- 35 Es tratada mediante administración oral con una preparación de una proteína de fusión de TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31). Después de ocho días ya no expresa leche materna y sus niveles de humedad vaginal han mejorado significativamente. Después de siete semanas la sequedad comienza a reaparecer pero es revertida casi inmediatamente mediante un segundo tratamiento. Los tratamientos continúan en visitas cada seis semanas a la clínica de salud sexual, donde la mujer informa de haber vuelto a su actividad sexual normal.

Ejemplo 15: Método para recuperar la pérdida de peso a través del tratamiento de insulinoma

- 45 Una mujer de 64 años de edad con un IMC de 39 ha sido diagnosticada con insulinoma inoperable. Desea conseguir una reducción sostenida del apetito y del peso que le permitan mantener un interés activo por el ejercicio físico, por lo que es tratada mediante inyección sistémica de una proteína de fusión que comprende un TM de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31). En el plazo de 10 a 14 días después del tratamiento su ganancia de peso se ha estabilizado y a los 30 días se produce una pérdida de peso. La paciente mantiene una pérdida de peso significativa siempre que se mantenga la medicación con una serie de inyecciones cada 24 semanas.

Ejemplo 16: Método para tratar el glucagonoma

- 50 Una mujer de 63 años de edad visita a su doctor en un estado angustiado, habiendo desarrollado sarpullidos en las nalgas, alrededor de las ingles y en la parte inferior de las piernas. Los análisis sanguíneos demuestran que es anémica y diabética. También padece episodios diarreicos frecuentes. El médico sospecha la presencia de glucagonoma y un escáner CT confirma la existencia de un tumor en la cola del páncreas.

La paciente es tratada con una proteína de fusión que comprende un TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31). Tras 4 semanas, los episodios diarreicos han remitido y los sarpullidos se han

reducido significativamente. Su recuento sanguíneo de glóbulos rojos también ha vuelto a la normalidad. El tratamiento se repite en intervalos de seis semanas y los síntomas permanecen de forma general bajo control.

Ejemplo 17: Método para tratar la diarrea y el rubor producido por el VIPoma

5 Un hombre de 49 años de edad padece diarrea secretora asociada a rubor clínico. Las pruebas clínicas indican acidosis metabólica, y un escáner CT abdominal revela un tumor –casi con total seguridad un VIPoma– cerca del páncreas.

10 La cirugía no está disponible para el paciente por lo que es tratado con una proteína de fusión que comprende un TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31). En 3 semanas el rubor se ha frenado y la diarrea se ha vuelto menos frecuente. A las siete semanas después del tratamiento todos los síntomas han desaparecido y permanecen ausentes siempre que se repita la terapia en intervalos de aproximadamente 8 semanas.

Ejemplo 18: Método para tratar el gastrinoma

15 Un hombre de 47 años de edad padece de ulceración péptica grave que produce un dolor abdominal debilitante. También experimenta episodios diarreicos inexplicables y finalmente se le diagnostica un gastrinoma intrapancreática a través de análisis de sangre y un estudio de ultrasonidos abdominal.

20 Es tratado mediante inyección intra-tumoral de una medicación que consiste en una proteína de fusión que comprende un TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31), o una fusión que comprende un TM de péptido GnRH (p.ej., SEQ ID 93-94). En una semana los síntomas gástricos dolorosos comienzan a mejorar. La hipergastrinemia ha remitido y los episodios diarreicos se han reducido en gravedad y en frecuencia. Este estatus permanece durante 7 semanas pero los niveles de gastrina en sangre comienzan a elevarse de nuevo después de eso. Se repite la terapia en intervalos de 7 semanas y esto mantiene la gastrina en sangre en niveles normales y no reaparece ningún otro síntoma.

Ejemplo 19: Método para tratar la tirotoxicosis producida por un tirotrofinoma

25 Una mujer de 39 años de edad miembro de tripulación de cabina de una línea aérea visita a su médico quejándose de una sudoración excesiva, ligada a nerviosismo previamente desconocido, que han comenzado a afectar a su capacidad para llevar a cabo su trabajo. Durante la consulta se evidencia un ligero temblor y el doctor sospecha de una tirotoxicosis. La mujer es derivada a un endocrinólogo que lleva a cabo una serie de pruebas sanguíneas. Las principales anormalidades detectadas son niveles elevados de tiroxina, pero también hay niveles elevados de TSH (tirotrófina), indicativo de un tirotrofinoma. Un escáner de IRM de la cabeza confirma la presencia de un tumor pituitario.

30 La mujer es tratada con una medicación que consiste en una proteína de fusión que comprende un TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31). Tanto la sudoración como el nerviosismo remiten a lo largo de las siguientes dos semanas. Las pruebas sanguíneas quincenales de seguimiento muestran una caída de los niveles tanto de tiroxina como de tirotrófina, y alcanzan niveles normales a las seis semanas. La paciente es capaz de recuperar completamente su actividad laboral.

Ejemplo 20: Método para tratar el hinchamiento recurrente de tejidos blandos producido por la acromegalia

40 Una mujer de 72 años, que ya había sido sometida a cirugía transesfenoidal para eliminar un macroadenoma pituitario, presenta recurrencia de síntomas acromegálicos (principalmente hinchamiento de dedos y lengua y aumento de cansancio y letargia). Un escáner de IRM craneal revela la presencia de un microadenoma pituitario putativo y los análisis sanguíneos posteriores confirman niveles elevados de GH e IGF-1 en circulación.

45 Se considera que la cirugía es incompatible con las afecciones médicas pre-existentes de tal modo que es tratada con una medicación que consiste en una proteína de fusión que comprende un TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31). Después de una semana informa de que se siente más activa de forma general y que el hinchamiento de dedos y lengua se han reducido notablemente. A las tres semanas los síntomas recurrentes han revertido completamente y un examen endocrinológico confirma la normalización de los niveles de GH e IGF-1. Es monitorizada de forma mensual y se le administran tratamientos repetidos en intervalos de 10 semanas. Este régimen de dosis mantiene los niveles hormonales dentro del rango normal y evita la recurrencia de los síntomas.

Ejemplo 21: Método para tratar el hirsutismo facial excesivo producido por la enfermedad de Cushing

50 Una consultora estética de 27 años de edad comienza a desarrollar un crecimiento de vello facial evidente. Éste no es tratado adecuadamente mediante métodos depilatorios estándar y está generando problemas psicológicos graves (ansiedad, depresión) tanto en el ámbito laboral como en su vida personal. Su médico sospecha de la existencia de un síndrome de Cushing por lo que es derivada a un endocrinólogo. Las pruebas de sangre y orina revelan niveles elevados de cortisol y ACTH, y una prueba de estimulación de CRH da positivo, confirmando la probabilidad de un

tumor pituitario secretor de ACTH. Los escáneres CT adrenal y pituitario confirman la presencia de un tumor pituitario pero no de anomalía adrenal.

Tras debatir con los médicos, la paciente opta por una intervención médica y es tratada con una medicación que consiste en una proteína de fusión que comprende un TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31), o una fusión que comprende un TM de péptido de GnRH (p.ej., SEQ ID 93-94). A los diez días la mujer comienza a sentirse más positiva y a partir de las dos semanas pasa a usar las cremas decolorantes o depilatorias con una frecuencia mucho menor. Los síntomas comienzan a reaparecer alrededor de las diez a doce semanas por lo que se administra un segundo tratamiento. Se produce un patrón similar de remisión de síntomas, reaparición gradual y tratamiento. Durante el tercer tratamiento, la paciente elige una eliminación quirúrgica del tumor pituitario. Una monitorización de seguimiento durante los dos siguientes años evidencia la no recurrencia de los síntomas o del tumor.

Ejemplo 22: Método para tratar la galactorrea masculina producida por el prolactinoma

Un jugador de rugby de 40 años de edad ha estado preocupado durante algún tiempo por un aumento del tamaño pectoral más allá de lo esperable por el entrenamiento. Se muestra muy preocupado cuando observa un goteo de leche en el pecho izquierdo. Su médico sospecha inmediatamente de la existencia de un prolactinoma pituitario y lo deriva a un radiólogo y al endocrinólogo. La analítica sanguínea revela hiperprolactinemia pero una función tiroidea normal. Un escáner de IRM craneal muestra la presencia de un tumor pituitario.

En ausencia de cualquier efecto de masa tumoral, el hombre es tratado con una medicación que consiste en una proteína de fusión que comprende un TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31). Después de tan solo cuatro días la expresión de leche ha cesado y tras seis semanas se ha producido una reducción medible del tejido pectoral no muscular. Durante este periodo, se midió quincenalmente el nivel de prolactina en sangre y había retornado a la normalidad para la medida de la cuarta semana. El tratamiento se repite en intervalos de 12 semanas, tiempo durante el cual no hay recurrencia de síntomas ni indicación de crecimiento tumoral. La cirugía u otro tratamiento reductor del tumor son considerados innecesarios mientras se mantengan estas condiciones.

Ejemplo 23: Método para tratar síntomas múltiples producidos por el insulinoma

Un hombre de 51 años de edad es diagnosticado con insulinoma después de presentarse al doctor con una variedad de afecciones de aparición reciente que incluyen visión borrosa, palpitaciones, debilidad, amnesia y, en dos ocasiones en tres meses, desvanecimiento. El diagnóstico es confirmado mediante pruebas endocrinológicas y radiográficas.

Es tratado con una medicación que consiste en una proteína de fusión que comprende un TM de péptido de somatostatina o cortistatina (p.ej., SEQ ID 7-16, 18-24, 26-31), o una fusión que comprende un TM de péptido de GnRH (p.ej., SEQ ID 93-94). En una semana su visión y sus niveles de energía han vuelto a la normalidad y continúa mejorando a lo largo de la siguiente quincena. A las cuatro semanas ya no es hipoglucémico y en ese momento se lleva a cabo la enucleación laparoscópica de un tumor de cabeza pancreática. La posterior monitorización del paciente no registra reaparición de síntomas o de masa tumoral y el paciente permanece sano después de tres años.

Ejemplo 24: Método para tratar pacientes acromegálicos resistentes a análogos de somatostatina

Tras 3 años de control con éxito de los niveles de GH e IGF-1 en circulación mediante análogos de somatostatina, una trabajadora de oficina acromegálica de 54 años de edad informa de un incremento obvio de una condición de piel aceitosa y también de un olor corporal prominente como resultado de una hiperhidrosis. Se descubre que es tolerante a la glucosa y que presenta niveles elevados de IGF-1 en circulación, y una dosis creciente de SSA no los controla.

Es tratada mediante inyección intravenosa de una proteína de fusión que comprende un TM de péptido de hormona de liberación de hormona del crecimiento (p.ej., SEQ ID 34, 42-47, 60-92). A los 14 días, la paciente informa de una reducción significativa de la sudoración. A lo largo del siguiente mes su piel aceitosa retorna a la normalidad y en ese momento los niveles de GH e IGF-1 están ambos en el rango normal. Esta situación se mantiene a lo largo de los siguientes cinco años.

Ejemplo 25: Método para tratar la enfermedad de Cushing en pacientes intolerantes a análogos de somatostatina

Una recepcionista de 37 años de edad visita a su médico de cabecera para solicitar un tratamiento para la ansiedad y la depresión. El médico observa que la mujer presenta una cara redonda con un aumento de grasa alrededor del cuello y también con brazos y piernas normales. Tras ser preguntada, confirma un ciclo menstrual irregular. Se mide un nivel de cortisol libre urinario de 24 horas de 150 µg, lo que sugiere la presencia de un síndrome de Cushing. Un escáner de IRM abdominal no detecta tumores adrenales presentes, pero un escáner de IRM craneal revela un pequeño tumor pituitario.

La paciente se considera inadecuada para intervención quirúrgica por lo que es tratada con una inyección intravenosa de proteína de fusión que comprende un TM de péptido de urotensina (p.ej., SEQ ID 48).

Ejemplo 26: Método para revertir la impotencia sexual femenina a través del tratamiento del prolactinoma

5 Una mujer de 28 años de edad visita a su doctor, preocupada por una reciente expresión de leche materna, a pesar de presentar un negativo en la prueba de embarazo. Un examen también indica sequedad vaginal y ella confirma que ha perdido la libido. Los resultados de las pruebas clínicas son normales en general con la excepción notable de una moderada hiperprolactinemia. Un escáner de IRM craneal indica un adenoma pituitario, consistente con los niveles elevados de prolactina.

10 Es tratada mediante administración intravenosa con una proteína de fusión que comprende un TM de péptido de grelina (GHRP) (p.ej., SEQ ID 33, 35, 38), o con una fusión que comprende un TM de péptido GnRH (p.ej., SEQ ID 93-94). Después de cuatro días ya no expresa leche materna y sus niveles de humedad vaginal han mejorado significativamente. Después de trece semanas la sequedad comienza a reaparecer pero es revertida casi inmediatamente mediante un segundo tratamiento. Los tratamientos continúan en visitas cada doce semanas a la clínica de salud sexual, donde la mujer informa de haber vuelto a su actividad sexual normal.

15 **Ejemplo 27: Método para tratar la enfermedad de Cushing**

Una mecanógrafa de 30 años de edad visita a su médico de cabecera para solicitar un tratamiento para la ansiedad y la depresión. El médico observa que la mujer presenta una cara redonda con un aumento de grasa alrededor del cuello y también con brazos y piernas más delgados de lo normal. Tras ser preguntada, confirma un ciclo menstrual irregular. Se mide un nivel de cortisol libre urinario de 24 horas de 200 µg, lo que sugiere la presencia de un 20 síndrome de Cushing. Un escáner de IRM abdominal no detecta tumores adrenales presentes, pero un escáner de IRM craneal revela un pequeño tumor pituitario.

La paciente se considera inadecuada para intervención quirúrgica por lo que es tratada con una proteína de fusión que comprende un TM de péptido de bombesina (GRP) (p.ej., SEQ ID 40-41), o una fusión que comprende un TM de péptido GnRH (p.ej., SEQ ID 93-94).

25 **Ejemplo 28: Método para tratar el gastrinoma**

Un hombre de 63 años de edad padece una ulceración péptica grave que produce dolor abdominal debilitante. También experimenta episodios diarreicos inexplicables y finalmente se le diagnostica un gastrinoma intrapancreático por los análisis de sangre y por un estudio abdominal de ultrasonidos.

30 Es tratado mediante inyección intra-tumoral de una medicación que consiste en una proteína de fusión que comprende un análogo de TM de péptido de somatostatina o cortistatina (octreotide – SEQ ID 54), que ha sido conjugado químicamente a la proteína proteasa-traslocalización (p.ej., SEQ ID 49-53). En una semana los síntomas gástricos dolorosos comienzan a mejorar. La hipergastrinemia ha remitido y los episodios diarreicos se han reducido en gravedad y frecuencia. Dicho estatus se mantiene durante 8 semanas, pero después de eso los niveles de gastrina en sangre comienzan a elevarse. Se repite la terapia en intervalos de 8 semanas y esto mantiene la 35 gastrina en sangre en niveles normales, y ningún otro síntoma muestra recurrencia.

Ejemplo 29: Método para aliviar los síntomas acromegálicos reduciendo los niveles elevados de GH e IGF-1 resultantes de un adenoma pituitario

40 Una mujer de 50 años de edad informa a su médico de cabecera de incidentes crecientes de apnea del sueño y también de un aumento de piel aceitosa, y el médico de cabecera observa un crecimiento óseo anormal. El médico de cabecera recomienda medir el nivel de IGF-1 en circulación y se observa que es elevado. Pruebas posteriores también muestran niveles de GH en circulación por encima de lo normal, por lo que se realiza un escáner de IRM craneal. Éste muestra un tumor pituitario de 5 mm de diámetro. La paciente es tratada con una proteína de fusión de MCH (p.ej., SEQ ID 57) mediante inyección i.v.

45 A intervalos de 1 semana se determinan los niveles de IGF-1 en circulación y se observa que son inferiores a la primera medida y que se reducen constantemente hasta un 5% por encima de lo normal a lo largo de las siguientes ocho semanas. Se observa que el nivel de GH en circulación es normal en ese momento. Una dosis adicional de la medicación con medidas de IGF-1 cada dos semanas muestra que dicha hormona se ha estabilizado en el extremo superior del rango normal. A las seis semanas del segundo tratamiento un escáner de IRM craneal revela una reducción del tumor hasta los 3 mm. Se continúa con la terapia con una dosis reducida en intervalos de dos meses, 50 midiéndose los niveles de IGF-1 y GH en la séptima semana. Ambos son estables en el rango normal y tanto la apnea del sueño como la piel aceitosa han desaparecido.

Ejemplo 30: Método para tratar pacientes acromegálicos resistentes a análogos de somatostatina

Después de 1 año de control con éxito de los niveles de GH e IGF-1 en circulación mediante análogos de somatostatina, un operario de excavadora acromegálico de 40 años de edad informa de un evidente aumento de piel

aceitosa y también de un olor corporal prominente como resultado de una hiperhidrosis. Se descubre que es intolerante a la glucosa y que presenta niveles elevados de IGF-1 en circulación, y una dosis creciente de SSA no los controla.

- 5 Es tratado mediante inyección intravenosa de una proteína de fusión que comprende un TM de péptido de unión a KISS1R (p.ej., SEQ ID 58), o una fusión que comprende un TM de péptido GnRH (p.ej., SEQ ID 93-94). A los 14 días el paciente informa de una reducción significativa de la sudoración. A lo largo del siguiente mes, la piel aceitosa retorna a la normalidad y en ese momento sus niveles de GH e IGF-1 se encuentran ambos dentro del rango normal. Esta situación se mantiene a lo largo de los siguientes cinco años.

Ejemplo 31: Método para tratar la acromegalia

- 10 Una paciente informa a su médico de cabecera que ya no le entran sus zapatos de talla 8, un talla que ha estado llevando los últimos 25 años, y que su anillo de boda tampoco le entra. Tras descartar un problema de obesidad, el médico de cabecera sospecha que podría ser el resultado de un trastorno pituitario y refiere a la paciente a pruebas que confirman unos niveles de IGF-1 y GH significativamente elevados. Un escáner de IMR craneal confirma la presencia de un adenoma pituitario.
- 15 Es tratada mediante inyección intravenosa de una proteína de fusión que comprende un TM de péptido de unión a receptor de hormona liberadora de prolactina (p.ej., SEQ ID 59). A lo largo de los siguientes meses los niveles de GH e IGF-1 vuelven a la normalidad y esto se mantiene mediante una inyección trimestral de la proteína de fusión.

Ejemplo 32: Actividad de CP-GHRH-LHD en los niveles de IGF-1 de rata *in vivo*

Objetivos

- 20 Determinar el impacto de la administración *i.v.* de una fusión CP-GHRH-LHD sobre los niveles de IGF-1 en ratas cinco días después del tratamiento en comparación con un control tratado solo con vehículo.

Materiales y métodos

- 25 Animales: ratas Sprague-Dawley machos adultos mantenidos en condiciones estándar de alojamiento con luz encendida a las 05:00h (14L:10D), disponibilidad *ad libitum* de comida y agua y habituados a las condiciones de alojamiento durante al menos 1 semana antes de la cirugía.

- 30 Cirugía: en el día 1 del estudio las ratas (200-250 g) serán anestesiadas con una combinación de Hypnorm (0,32 mg/kg de citrato de fentanilo y 10 mg/kg de fluanisón, *i.m.*) y diazepam (2,6 mg/kg *i.p.*). La vena yugular derecha es expuesta y se inserta una cánula de polietileno con punta silástica (d.i. 0,50 mm, d.e. 0,93 mm) (Portex, R.U.) en el vaso sanguíneo hasta que se aloja próxima al atrio derecho. Las cánulas serán llenadas previamente con una disolución salina isotónica heparinizada (10 IU/mL). El extremo libre de las cánulas se exteriorizará a través de una incisión de escalpelo y después se tunelará a través de un muelle protector anclado al cráneo usando dos tornillo de acero inoxidable y acrílico dental auto-curable. Tras la recuperación, los animales son albergados en jaulas individuales en el cuarto de muestreo sanguíneo automatizado. El final del muelle protector es unido a una rótula mecánica que permite al animal una libertad de movimiento máxima. Las cánulas son lavadas diariamente con disolución salina heparinizada para mantener la permeabilidad.
- 35

Tratamiento: a las 09:00h del día 2 del estudio las ratas recibirán una inyección *i.v.* de CP-GHRH-LHD o de control de vehículo solo.

- 40 Muestreo: el sistema de muestreo sanguíneo automatizado (ABS, del inglés "automated blood-sampling system") ha sido descrito previamente (Clark et al., 1986; Windle et al., 1997). De tres a cuatro días después de la cirugía las cánulas de la vena yugular de cada animal se conectarán al sistema de muestreo sanguíneo automatizado. A las 07:00h del día 6 se iniciará el muestreo. Las muestras de sangre se recogerán en intervalos de 10 minutos usando el sistema automatizado durante un periodo de 24 horas. Se tomarán un total de 144 muestras de sangre para cada rata, que no contendrán más de 38 μ L de sangre entera.

Resultados

- 45 Los niveles de IGF-1 fueron medidos usando un kit ELISA de IGF-1. La Figura 5 ilustra una reducción estadísticamente significativa de los niveles de IGF-1 en las ratas tratadas con la fusión en comparación con el control solo de vehículo con un valor-P del test-T = 0,0416 después de tan solo cinco días.

Ejemplo 33: Actividad de CP-GHRH-LHD en los niveles de IGF-1 de rata *in vivo*

Objetivos:

- 50 Este estudio está diseñado para investigar curso temporal de la actividad para la fusión CP-GHRH-LHD identificando el retraso temporal entre la administración y el efecto inicial del compuesto en los niveles de IGF-1.

Materiales y métodos:

Animales: ratas Sprague-Dawley machos adultos mantenidos en condiciones estándar de alojamiento con luz encendida a las 05:00h (14L:10D), disponibilidad *ad libitum* de comida y agua y habituados a las condiciones de alojamiento durante al menos 1 semana antes de la cirugía.

- 5 Cirugía: en el día 1 del estudio las ratas (260-280 g) serán anestesiadas con una combinación de Hypnorm y diazepam. La vena yugular derecha es expuesta y se inserta una cánula de polietileno con punta silástica (d.i. 0,50 mm, d.e. 0,93 mm) (Portex, R.U.) en el vaso sanguíneo hasta que se aloja próxima al atrio derecho. Las cánulas serán llenadas previamente con una disolución salina isotónica heparinizada (10 IU/mL). El extremo libre de las cánulas se exteriorizará a través de una incisión de escalpelo y después se tunelará a través de un muelle protector anclado al cráneo usando dos tornillo de acero inoxidable y acrílico dental auto-curable. Tras la recuperación, los animales son albergados en jaulas individuales en el cuarto ABS. El final del muelle protector es unido a una rótula mecánica que permite al animal una libertad de movimiento máxima. Las cánulas son lavadas diariamente con disolución salina heparinizada para mantener la permeabilidad.

- 15 Tratamiento: a las 10:00h del día 5 del estudio las ratas recibirán una inyección i.v. de CP-GHRH-LHD o de vehículo (salino esterilizado).

Muestreo: tras limpiar las cánulas se tomará una muestra de sangre manual individual (100 µL) de cada rata a las 09:30h. Se tomarán muestras desde el día 5 hasta el día 18 del experimento (o hasta que las cánulas se bloqueen). Se almacenará el plasma de las muestras sanguíneas a -20°C para un análisis posterior del contenido de IGF-1 mediante un kit ELISA.

20 **Resultados**

La Figura 6 ilustra una reducción estadísticamente significativa de los niveles de IGF-1 en las ratas tratadas con la fusión en comparación con el control solo de vehículo desde el día cuatro desde el tratamiento.

Ejemplo 34: Actividad de CP-GHRH-LHD en los niveles de hormona de crecimiento de rata *in vivo*

Objetivos

- 25 Determinar el impacto de la administración *i.v.* de la fusión CP-GHRH-LHD sobre los niveles de hormona de crecimiento en ratas cinco días después de tratamiento en comparación con controles de infusión tratados solo con vehículo o con Octreotide.

Materiales y métodos

- 30 Animales: ratas Sprague-Dawley machos adultos mantenidos en condiciones estándar de alojamiento con luz encendida a las 05:00h (14L:10D), disponibilidad *ad libitum* de comida y agua y habituados a las condiciones de alojamiento durante al menos 1 semana antes de la cirugía.

- 35 Cirugía: en el día 1 del estudio las ratas (200-250 g) serán anestesiadas con una combinación de Hypnorm (0,32 mg/kg de citrato de fentanilo y 10 mg/kg de fluanisona, i.m.) y diazepam (2,6 mg/kg i.p.). La vena yugular derecha es expuesta y se inserta una cánula de polietileno con punta silástica (d.i. 0,50 mm, d.e. 0,93 mm) (Portex, R.U.) en el vaso sanguíneo hasta que se aloja próxima al atrio derecho. Las cánulas serán llenadas previamente con una disolución salina isotónica heparinizada (10 IU/mL). El extremo libre de las cánulas se exteriorizará a través de una incisión de escalpelo y después se tunelará a través de un muelle protector anclado al cráneo usando dos tornillo de acero inoxidable y acrílico dental auto-curable. Tras la recuperación, los animales son albergados en jaulas individuales en el cuarto de muestreo sanguíneo automatizado. El final del muelle protector es unido a una rótula mecánica que permite al animal una libertad de movimiento máxima. Las cánulas son lavadas diariamente con disolución salina heparinizada para mantener la permeabilidad.

- 45 Tratamiento: a las 09:00h del día 2 del estudio las ratas recibirán una inyección i.v. de compuesto activo Sintaxina o de vehículo. 6 horas después del inicio del muestreo comenzará una infusión de 12 horas de somatostatina (o un análogo) (administrada a través de una de las líneas de cánula dual) y continuará solo durante 12 horas. [Este horario de infusión debería ser un excelente control de ensayo de GH, puesto que se debería ver la secreción de línea base, después de la inhibición completa y después una rápida recuperación/rebote]

- 50 Muestreo: el sistema de muestreo sanguíneo automatizado (ABS) ha sido descrito previamente (Clark et al., 1986; Windle et al., 1997). De tres a cuatro días después de la cirugía las cánulas de la vena yugular de cada animal se conectarán al sistema de muestreo sanguíneo automatizado. A las 07:00h del día 6 se iniciará el muestreo. Las muestras de sangre se recogerán en intervalos de 10 minutos usando el sistema automatizado durante un periodo de 24 horas. Se tomarán un total de 144 muestras de sangre para cada rata, que no contendrán más de 38 µL de sangre entera.

Resultados

5 Los niveles de hormona de crecimiento fueron medidos usando un ensayo RIA. La Figura 7a ilustra los animales tratados con vehículo que presentan un liberación pulsada típica de hormona de crecimiento, la Figura 7b ilustra la eliminación completa de la liberación pulsada de hormona de crecimiento tras el tratamiento con la quimera GHRH-LHD, y la Figura 7c muestra el bloqueo de la liberación pulsada de hormona de crecimiento y la posterior recuperación cuando se detiene la infusión de Octreotide.

REIVINDICACIONES

- 1.** Un polipéptido para uso en la supresión de la secreción desde una célula tumoral neuroendocrina para tratar la acromegalia, comprendiendo dicho polipéptido:
- 5 a. una proteasa no citotóxica, proteasa que es capaz de romper una proteína del aparato de fusión exocítico en una célula tumoral pituitaria, en donde dicha proteasa no citotóxica es una proteasa de neurotoxina clostridial o una proteasa de IgA;
- b. un Resto dirigido a diana (TM) que se une a un sitio de unión en una célula tumoral pituitaria, sitio de unión que es capaz de someterse a endocitosis para incorporarse a un endosoma dentro de la célula tumoral pituitaria, en donde el TM comprende un péptido de hormona de liberación de hormona del crecimiento (GHRH); y
- 10 c. un dominio de traslocalización bacteriano o vírico que traslocaliza la proteasa desde dentro del endosoma, a través de la membrana endosomal y al citosol de dicha célula tumoral pituitaria;
- en donde el polipéptido carece de un dominio H_c funcional de una neurotoxina clostridial.
- 2.** Un polipéptido para uso según la Reivindicación 1, en donde la célula tumoral pituitaria deriva o contribuye a somatotrofinomas.
- 15 **3.** Un polipéptido para uso según cualquier reivindicación precedente, en donde el TM se une a un receptor de hormona de liberación de hormona del crecimiento (GHRH).
- 4.** Un polipéptido para uso según cualquier reivindicación precedente, en donde la proteasa no citotóxica comprende una cadena-L de neurotoxina clostridial o una proteasa de IgA; y/o
- en donde el dominio de traslocalización comprende un dominio de traslocalización de neurotoxina clostridial.
- 20 **5.** Un polipéptido que comprende:
- a. una proteasa no citotóxica, proteasa que es capaz de romper una proteína del aparato de fusión exocítico en una célula tumoral pituitaria, en donde dicha proteasa no citotóxica es una proteasa de neurotoxina clostridial o una proteasa de IgA;
- 25 b. un Resto dirigido a diana (TM) que se une a un sitio de unión en una célula tumoral pituitaria, sitio de unión que es capaz de someterse a endocitosis para incorporarse a un endosoma dentro de la célula tumoral pituitaria, en donde el TM comprende un péptido de hormona de liberación de hormona del crecimiento (GHRH); y
- c. un dominio de traslocalización bacteriano o vírico que traslocaliza la proteasa desde dentro del endosoma, a través de la membrana endosomal y al citosol de dicha célula tumoral pituitaria;
- 30 en donde el polipéptido carece de un dominio H_c funcional de una neurotoxina clostridial, y en donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90-92%, o al menos un 95-97%, o al menos un 98-99%, con respecto a una cualquiera de las SEQ ID NOs: 34, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91 o 92.
- 35 **6.** Un polipéptido según la Reivindicación 5, en donde el TM se une a un receptor de hormona de liberación de hormona del crecimiento (GHRH); en donde el TM comprende un péptido de hormona de liberación de hormona del crecimiento (GHRH).
- 7.** Un ácido nucleico que codifica un polipéptido según cualquiera de las Reivindicaciones 5 o 6.
- 8.** Un método para activar un polipéptido según la Reivindicación 5 o 6, método que comprende poner en contacto el polipéptido con una proteasa que rompe el polipéptido en un sitio de reconocimiento (sitio de ruptura) localizado
- 40 entre el componente de proteasa no citotóxica y el componente de traslocalización, y convertir el polipéptido en un polipéptido di-cadena en donde el componente de proteasa no citotóxica y el componente de traslocalización están unidos por un enlace disulfuro.
- 9.** Un polipéptido di-cadena que puede obtenerse mediante el método de la Reivindicación 8.

Figura 1

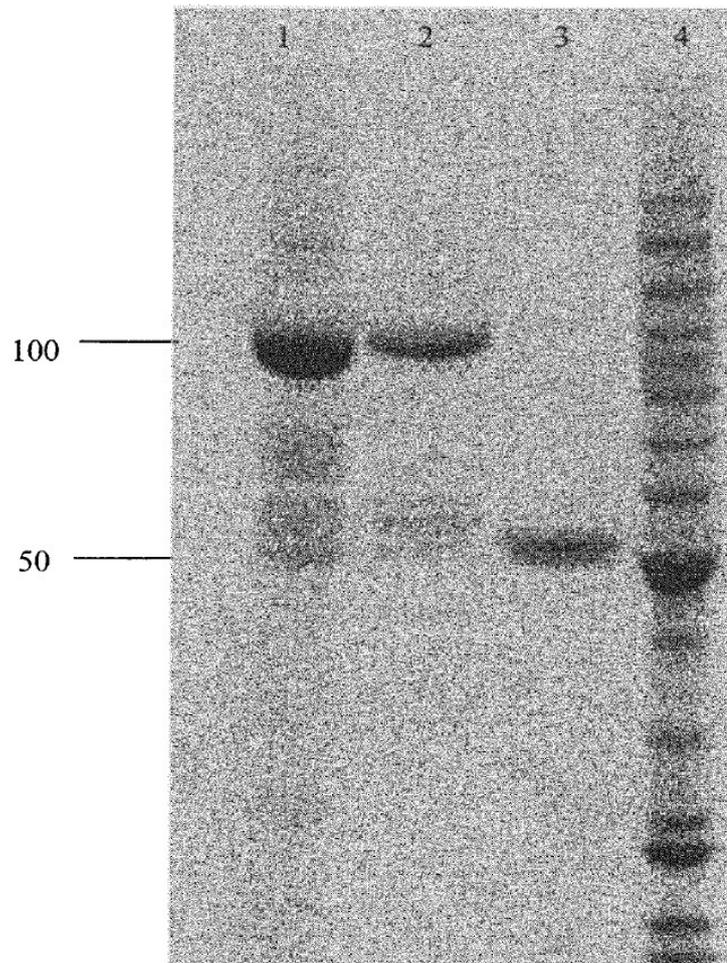


Figura 2

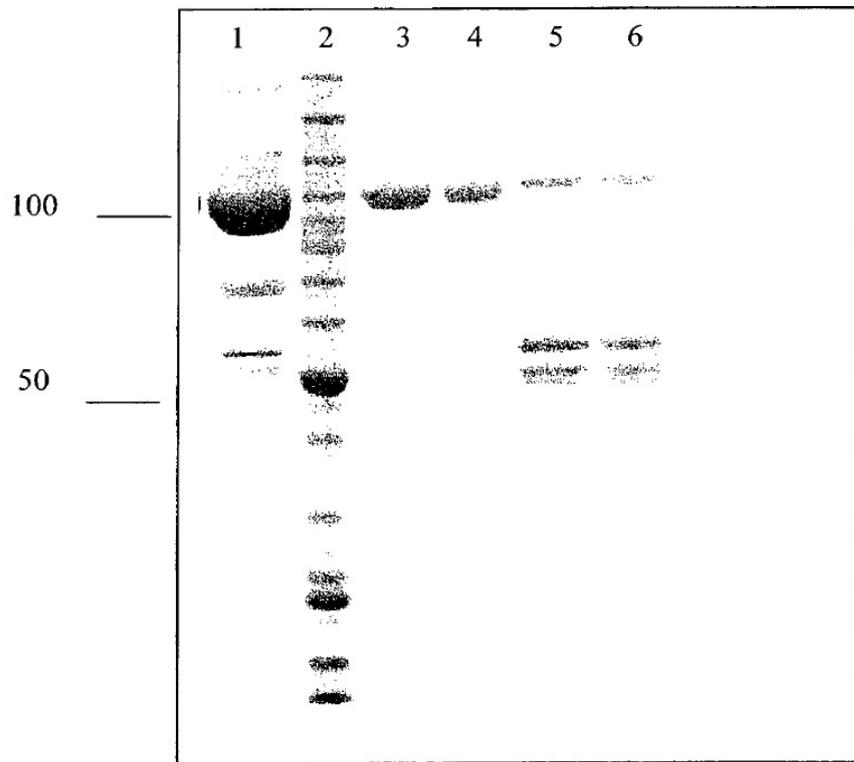


Figura 3a

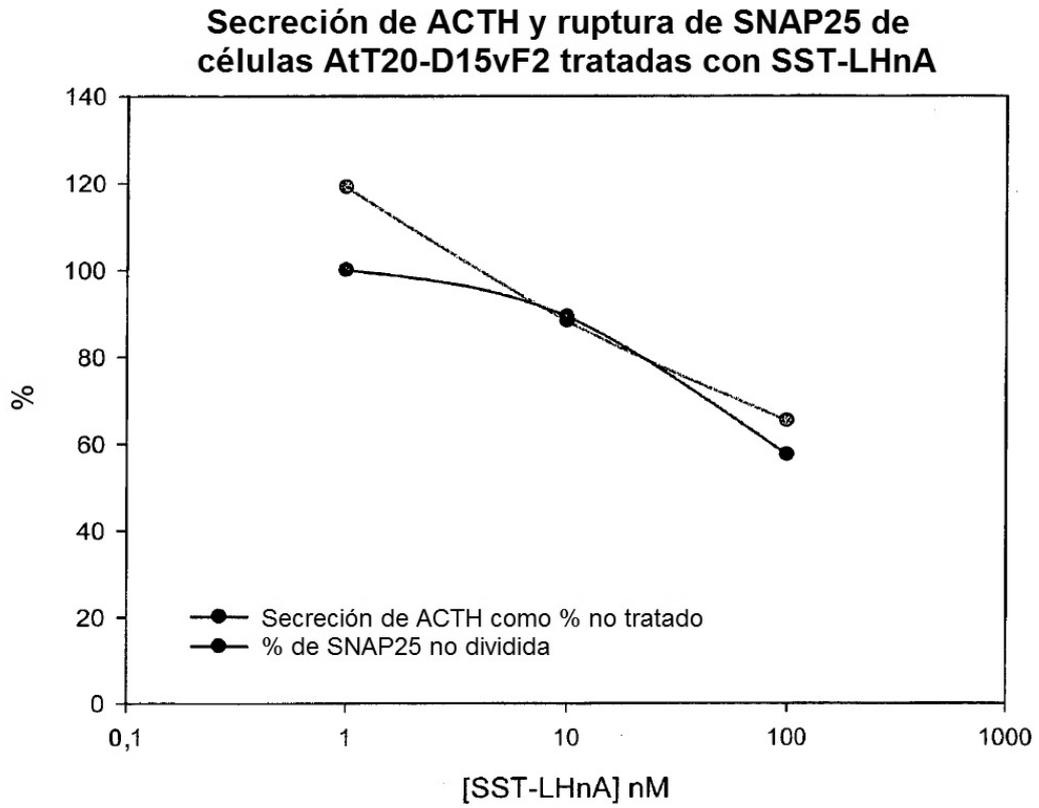


Figura 3b

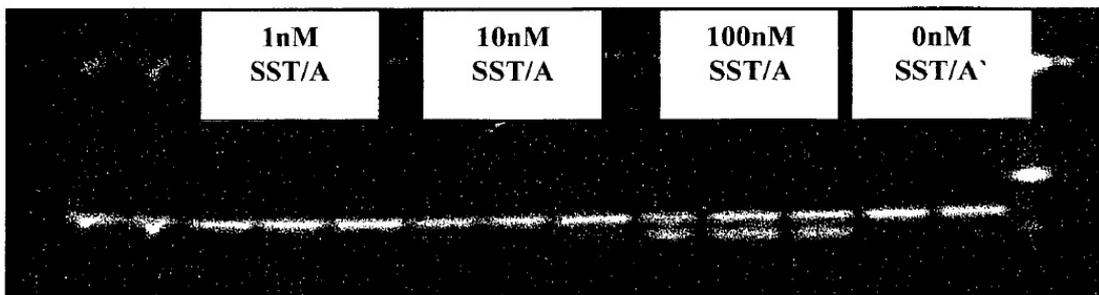


Figura 4

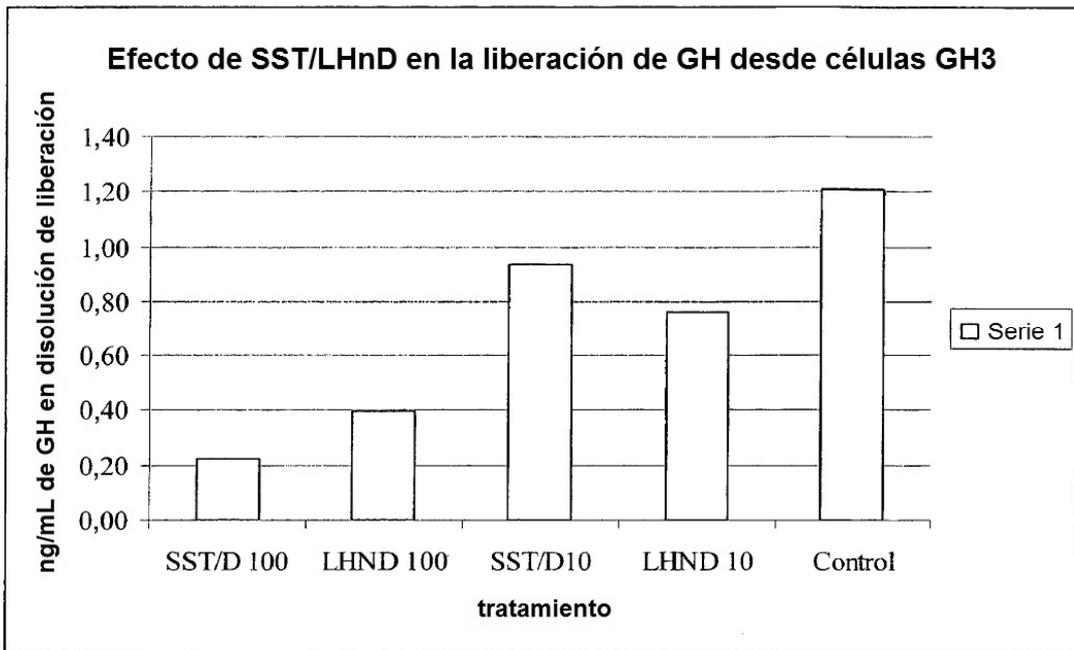
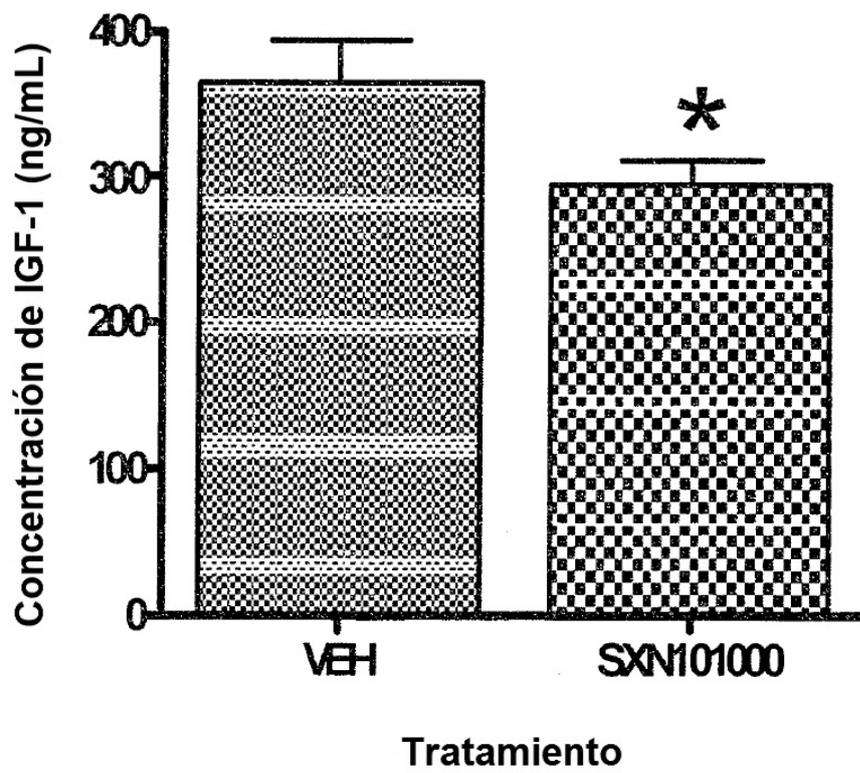


Figura 5



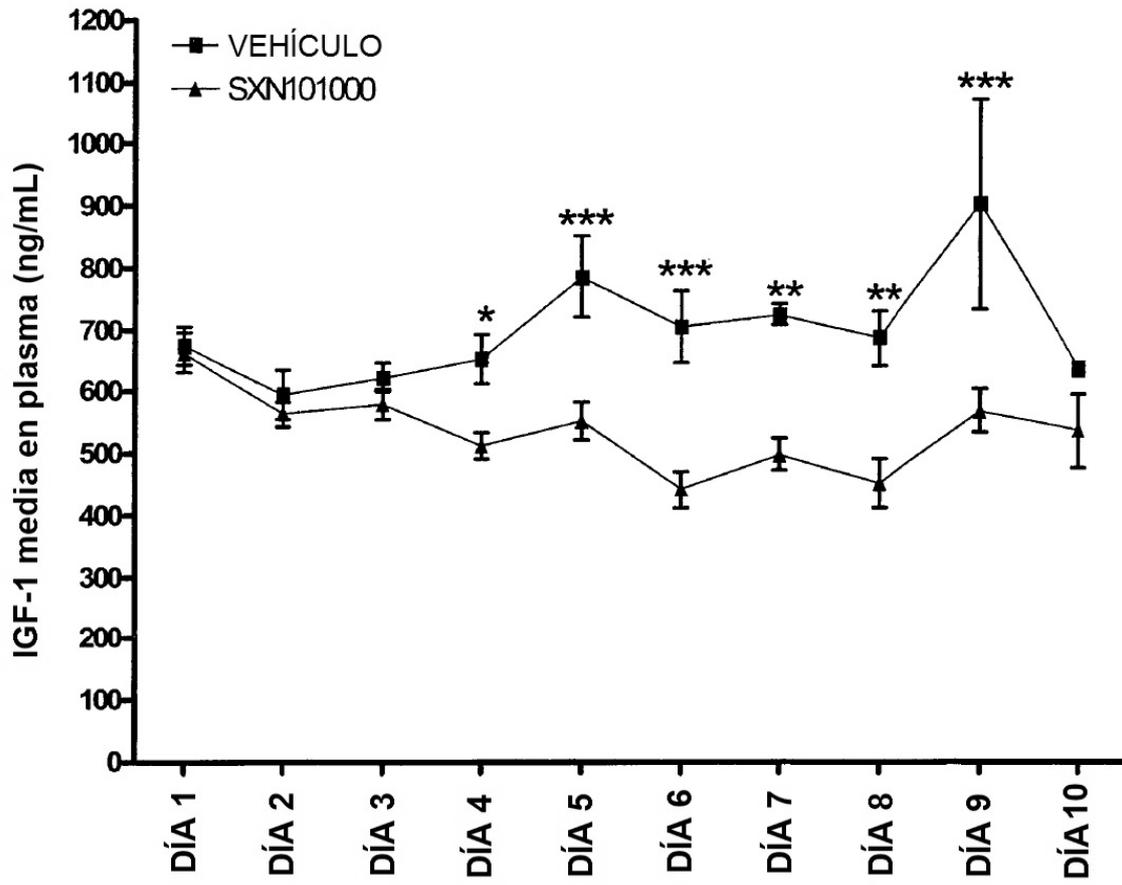


Figura 6

Figura 7a

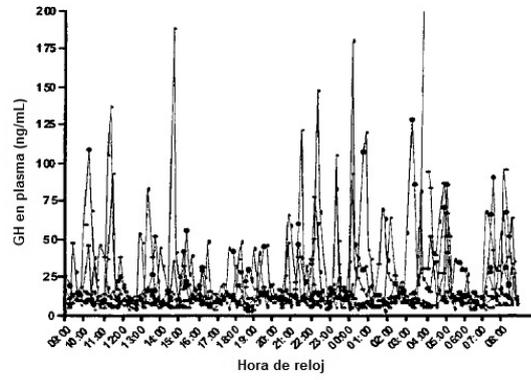


Figura 7b

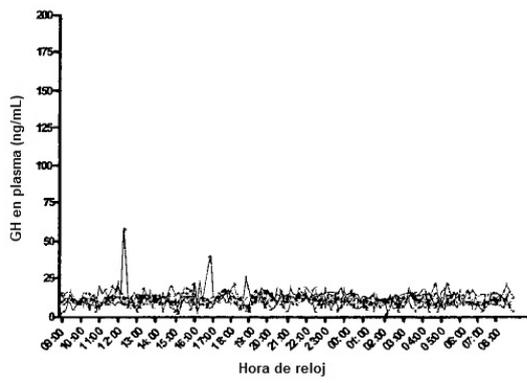


Figura 7c

