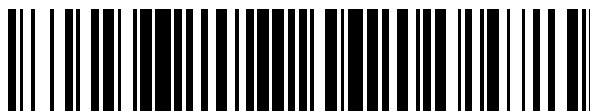


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 492**

51 Int. Cl.:

C07K 14/495

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2013** **PCT/US2013/034504**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013** **WO13149094**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2013** **E 13768513 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017** **EP 2831105**

54 Título: **Fusiones de receptores TGF tipo II y tipo III**

30 Prioridad:

28.03.2012 US 201261616740 P

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

03.01.2018

73 Titular/es:

**THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY
OF TEXAS SYSTEM (100.0%)**

**201 West 7th Street
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**HINCK, ANDREW;
SUN, LUZHEN y
ZWIEB, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 648 492 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

Fusiones de receptores tgf tipo ii y tipo iii

5 DECLARACIÓN RELATIVA A LA INVESTIGACIÓN FINANCIADA POR EL GOBIERNO FEDERAL

La presente invención se realizó con ayuda del gobierno con las becas CA079683 y GM58670 otorgadas por el Instituto Nacional del Cáncer y el Instituto Nacional de Ciencias Médicas Generales, respectivamente. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

10

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

Se ha presentado electrónicamente un listado de secuencias con esta solicitud. El listado de secuencias se incorpora en esta invención como referencia.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las isoformas ($\beta 1$, $\beta 2$, y $\beta 3$) del factor del crecimiento transformante beta (TGF β) son polipéptidos homodiméricos de 25 kDa. Se secretan en una forma latente y solo un pequeño porcentaje de los TGF β totales secretados se activan bajo condiciones fisiológicas. El TGF β se une a tres receptores de superficie celular llamados receptores tipo I (RI), tipo II (RII), y tipo III (RIII). RI y RII son receptores de serina/treonina quinasa. RIII (también llamado betaglicano) tiene dos sitios de unión de TGF β en su dominio extracelular, que se llaman dominios E y U (BG_E y BG_U, respectivamente). TGF $\beta 1$ y TGF $\beta 3$ se unen a RII con una afinidad que es 200-300 veces mayor que la de TGF- $\beta 2$ (Baardsnes y cols., *Biochemistry*, 48, 2146-55, 2009); en consecuencia, las células deficientes en RIII son de 200 a 300 veces menos sensibles a las concentraciones de TGF- $\beta 2$ equivalentes en comparación con TGF- $\beta 1$ y TGF $\beta 3$ (Chiefetz, y cols. (1990) *J. Bio. Chem.*, 265, 20533-20538). Sin embargo, en presencia de los RIII, las células responden casi por igual a las tres isoformas de TGF- β , de acuerdo con los informes que muestran que los RIII pueden unirse al ligando y presentarlo a los RII para aumentar la actividad de TGF β cuando está unido a la membrana (Chen y cols., *J. Biol. Chem.* 272, 12862-12867, 1997; Lopez-Casillas y cols., *Cell* 73, 1435-1444, 1993; Wang y cols., *Cell* 67, 797-805, 1991; Fukushima y cols., *J. Biol. Chem.* 268, 22710-22715, 1993; Lopez-Casillas y cols., *J. Cell Biol.* 124, 557-568, 1994). La unión de TGF β a los RII incorpora y activa los RI a través de la fosforilación (Wrana y cols., *Nature* 370, 341-347, 1994). El RI activado fosforila a los Smad2 y Smad3 intracelulares, que a su vez interactúan con Smad4 para regular la expresión génica en el núcleo. (Piek y cols., *FASEB J.* 13, 2105-2124, 1999; Massague and Chen, *Genes & Development* 14, 627-644, 2000). A través de su regulación de la expresión génica, el TGF β ha demostrado afectar a muchas funciones celulares como por ejemplo la proliferación celular, la diferenciación celular, la adhesión celular y de las células con la matriz, la motilidad celular, y la activación de los linfocitos (Massague, *Ann. Rev. Cell Biol.* 6, 597-641, 1990; Roberts and Sporn, *The transforming growth factor-betas*. In *Peptide growth factors and their receptors I*, Sporn and Roberts, eds. (Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 419-472, 1991). El TGF β también ha demostrado estar, o está implicado, en la inducción o mediación de la progresión de muchas enfermedades como por ejemplo la osteoporosis, la hipertensión, la aterosclerosis, la cirrosis hepática y enfermedades fibróticas del riñón, hígado y pulmón (Blobe y cols., *N. Engl. J. Med.* 342, 1350-1358, 2000). Tal vez, la función más ampliamente estudiada de TGF β es su papel en la progresión tumoral.

Los TGF β han demostrado ser unos potentes inhibidores del crecimiento en varios tipos de células incluyendo las células epiteliales (Lyons and Moses, *Eur. J. Biochem.* 187, 467-473, 1990). El mecanismo de la inhibición de crecimiento de TGF β se debe principalmente a la regulación de las proteínas relacionadas con el ciclo celular (Derynck, *Trends. Biochem. Sci.* 19, 548-553, 1994; Miyazono y cols., *Semin. Cell Biol.* 5, 389-398, 1994). Por lo tanto, la regulación aberrante de la maquinaria del ciclo celular como por ejemplo la pérdida del producto génico del retinoblastoma durante la tumorigénesis puede provocar una pérdida de la inhibición del crecimiento de TGF β . Además, se ha informado de la inactivación mutacional de los receptores de TGF β , Smad2 y Smad4 en varios carcinomas (Massague y cols., *Cell* 103, 295-309, 2000). Por ejemplo, a menudo se observa la pérdida de expresión de los RI y/o RII en algunos cánceres gastrointestinales humanos (Markowitz and Roberts, *Cytokine, Growth Factor, Rev.* 7, 93-102, 1996).

Mientras que muchas células de carcinoma pierden la respuesta a la inhibición del crecimiento de TGF β , al compararlas con sus homólogos normales, a menudo sobreproducen isoformas de TGF β activas (Reiss, *Microbes and Infection* 1, 1327-1347, 1999). Es probable que esto provoque la selección de células cancerosas que sean resistentes a la actividad inhibitoria del crecimiento de TGF β . De hecho un aumento en los niveles de TGF $\beta 1$ está fuertemente asociado con la progresión de muchos tipos de procedimientos cancerosos y malos resultados clínicos (Reiss, *Microbes and Infection* 1, 1327-1347, 1999). Por ejemplo, se ha demostrado que los niveles séricos de

TGFβ1 están correlacionados con la carga tumoral, la metástasis, y el antígeno específico de próstata sérico (PSA) en pacientes con cáncer de próstata (Adler y cols., J. Urol. 161, 182-187, 1999; Shariat y cols., J. Clin. Oncol. 19, 2856-2864, 2001). De acuerdo con estas observaciones, se observó un notable aumento de la expresión de TGFβ1 y TGFβ2 en una línea celular agresiva de cáncer de próstata humano independiente de andrógenos al compararla con la línea celular parental menos agresiva dependiente de andrógenos, LNCap (Patel y cols., J. Urol. 164, 1420-1425, 2000).

Se cree que varios mecanismos median en la actividad que favorece los tumores de TGFβ (Arteaga y cols., Breast Cancer Res. Treat. 38, 49-56, 1996; Reiss, Microbes and Infection 1, 1327-1347, 1999). El TGFβ es un potente inmunosupresor (Sosroseno and Herminajeng, Br. J. Biomed. Sci. 52, 142-148, 1995). La sobreexpresión de TGFβ1 en las células cancerosas de próstata en ratas se asoció con una reducción de la respuesta inmunitaria del huésped al crecimiento tumoral (Lee y cols., Prostate 39, 285-290, 1999). El TGFβ también ha demostrado ser angiogénico *in vivo* (Fajardo y cols., Lab. Invest. 74, 600-608, 1996; Yang and Moses, J. Cell Biol. 111, 731-741, 1990; Wang y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 8483-8488, 1999). La sobreexpresión de TGFβ durante la progresión del cáncer se asocia a menudo con el aumento de la angiogénesis y la metástasis sugiriendo que el TGFβ puede favorecer la metástasis estimulando la formación de vasos sanguíneos tumorales (Roberts and Wakefield, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 8621-8623, 2003). El TGFβ también juega un importante papel a la hora de favorecer de la metástasis ósea de los cánceres de próstata y de mama humanos (Koeneman y cols., Prostate 39, 246-261, 1999; Yin y cols., J. Clin. Invest. 103, 197-206, 1999). El tejido óseo, que es la mayor fuente de TGFβ en el cuerpo, produce tanto el TGFβ1 como el TGFβ2 (Bonewald and Mundy, Clin. Orthop. 261-276, 1990). El TGFβ latente puede activarse mediante proteasas como la PSA y el activador del plasminógeno uroquinasa, que son secretadas abundantemente por las células cancerosas (Koeneman y cols., Prostate 39, 246-261, 1999). Tomados conjuntamente, los TGFβ pueden actuar en el microambiente tumoral para favorecer el crecimiento del carcinoma, la angiogénesis y la metástasis.

Debido a su implicación en la progresión de diversas enfermedades, el TGFβ se ha destinado para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Una manera de antagonizar la actividad de TGFβ es utilizar el ectodominio del receptor tipo II de TGFβ o el receptor tipo III (betaglicano [BG]). Se ha demostrado previamente que la expresión ectópica de un RIII soluble (sBG) en líneas celulares de carcinoma humano pueden inhibir significativamente el crecimiento tumoral, la angiogénesis, y la metástasis cuando se inocula ratones sin pelaje (nude) atímicos (Bandyopadhyay y cols., Cancer Res. 59, 5041-5046, 1999; Bandyopadhyay y cols., Oncogene 21, 3541-3551, 2002b). Más recientemente, se ha demostrado que la administración sistémica de sRIII recombinante puede inhibir el crecimiento, la angiogénesis, y la metástasis de xenoinjertos de las células MDA-MB-231 del carcinoma mamario humano en ratones sin pelaje (Bandyopadhyay y cols., Cancer Res. 62, 4690-4695, 2002a). Sin embargo, la inhibición fue solo parcial. Esto podría ser debido, en parte, al hecho de que las células producen TGFβ1 activo y TGFβ2 activo y la potencia anti-TGFβ de sRIII es 10 veces menor para TGFβ1 que para TGFβ2 (Vilchis-Landeros y cols., Biochem. J. 355, 215-222, 2001). Curiosamente, mientras que el dominio extracelular de RII (sRII) tiene una afinidad muy baja para TGFβ2, su afinidad por TGFβ1 y TGFβ3 es más de diez veces mayor que la de sRIII (Lin y cols., J. Biol. Chem. 270, 2747-2754, 1995; Vilchis-Landeros y cols., Biochem. J. 355, 215-222, 2001).

Mientras que se han preparado y probado numerosos antagonistas de TGFβ, todos tienen propiedades inhibitoras incompletas de la isoforma TGFβ. Por lo tanto, existe la necesidad de antagonistas o inhibidores de TGFβ adicionales.

RESUMEN

Ciertas formas de realización están dirigidas a los novedosos polipéptidos heterotriméricos en los que el ectodominio del receptor tipo II de TGF-β (TβRII) se acopla a los extremos N o C terminales del dominio de endoglin (dominio E) del receptor tipo III de TGF-β (TβRIII). Este receptor trimérico, conocido como RER, puede unirse a las tres isoformas de TGF-β con afinidad subnanomolar y es eficaz para neutralizar la señalización inducida por las tres isoformas de TGF-β, pero no a otros ligandos de la superfamilia de TGF-β, como por ejemplo las activinas, los factores de crecimiento y diferenciación (GDF), y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP). La afinidad subnanomolar de la fusión, que surge de su capacidad para ponerse en contacto con el dímero de TGF-β en tres sitios distintos, le permite competir eficazmente con los receptores endógenos para la unión de TGF-β. Las proteínas de fusión descritas en esta invención ofrecen un importante potencial como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades provocadas por la sobreexpresión de las isoformas de TGF-β, como por ejemplo el cáncer y la fibrosis.

Ciertos aspectos están dirigidos a una proteína de fusión heterotrimérica que comprende (a) un segmento amino

terminal que comprende un primer dominio de unión a TGFβ de un receptor de TGFβ tipo II, (b) un segmento central que comprende un dominio de endogлина del receptor de TGFβ tipo III, y (c) un segmento carboxilo terminal que comprende un segundo dominio de unión a TGFβ del receptor de TGFβ tipo II.

- 5 Se proporciona un ejemplo de un receptor de TGFβ tipo II como la SEQ ID NO:6. Los aminoácidos 1 a 567 de la SEQ ID NO:6 son un precursor del receptor de TGFβ tipo II (número CE=2.7.11.30). El péptido señal está compuesto por los aminoácidos 1 a 22 de la SEQ ID NO:6. El péptido maduro incluye los aminoácidos 23 a 567 de la SEQ ID NO:6. El ectodominio se define por los aminoácidos 24 a 160 de la SEQ ID NO:6 (dominio RII). El ectodominio es seguido por una región transmembrana que abarca los aminoácidos 161 a 187 de la SEQ ID NO:6.
- 10 El segmento amino terminal del segmento carboxilo terminal de una nueva proteína de fusión heterotrimérica descrito en esta invención puede comprender, independientemente, un segmento aminoácido que es el 85, 90, 95, 98, o 100 % idéntico, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos, a los aminoácidos 35, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, o 75 a 145, 150, 155, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, o 170 de la SEQ ID NO:6, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos. La capacidad del segmento polipéptido
- 15 para unirse a TGFβ puede determinarse usando los ensayos de unión de ligando estándares conocidos por los expertos en la técnica. En ciertos aspectos el dominio RII comprende mutaciones puntuales que alteran la afinidad de unión del dominio RII o de la afinidad de unión de un polipéptido que comprende un dominio RII. En ciertos aspectos los residuos de los aminoácidos 27, 30, 32, 50, 51, 52, 53, 55, 118, y 119 se pueden alterar individualmente o en varias combinaciones.

- 20 Se proporciona un ejemplo de un receptor TGFβ de tipo III receptor como la SEQ ID NO:7 o la SEQ ID NO:8. Los aminoácidos 1 a 23 de la SEQ ID NO:7 o 1 a 21 de la SEQ ID NO:8 definen el péptido señal. Los aminoácidos 24-409 de la SEQ ID NO:7 o 21-406 de la SEQ ID NO:8 definen el dominio tipo endogлина (dominio o región E), los aminoácidos 410 a 783 de la SEQ ID NO:7 o 407-780 de la SEQ ID NO:8 definen el dominio tipo zona pelúcida o el
- 25 dominio tipo uromodulina (dominio o región U), y los aminoácidos 789 a 811 de la SEQ ID NO:7 o 786 a 808 de la SEQ ID NO:8 definen la región transmembrana. El segmento central de la proteína de fusión trimérica puede comprender un segmento aminoácido que es el 85, 90, 95, 98, o 100 % idéntico, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos, a los aminoácidos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, o 60 a 350, 355, 360, 361, 362, 364, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405 o 409 de la SEQ ID NO:7 o
- 30 la SEQ ID NO:8, incluyendo todos los valores e intervalos que existen entre ellos. En ciertos aspectos el dominio E comprende mutaciones puntuales que alteran la afinidad de unión del dominio E o de la afinidad de unión de un polipéptido que comprende un dominio E. En otra forma de realización, el segmento central de la proteína de fusión trimérica puede comprender un segmento aminoácido que es el 85, 90, 95, 98, o 100 % idéntico, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos, a los aminoácidos 405, 410, 415, 420, 425, 430, 440, 445, 450, 460, 470, 480,
- 35 490, 500, 510, 520, 530, 540, o 550 a 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, o 780 de la SEQ ID NO:7 o la SEQ ID NO:8, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos. La capacidad del segmento polipéptido para unirse a TGFβ puede determinarse usando los ensayos de unión de ligando estándares conocidos por los expertos en la técnica. En ciertos aspectos los aminoácidos 69, 71, 72, 90, 93, 99, 108, 115, 120, 144, 163, 192, 206, 237, 252, 274, 283, y 336
- 40 de la SEQ ID NO:7 se pueden alterar individualmente o en varias combinaciones, o los correspondientes aminoácidos de la SEQ ID NO:8.

- En ciertos aspectos, la proteína de fusión puede comprender además un conector entre el segmento amino terminal y el segmento central, y/o un conector entre el segmento central y el segmento terminal carboxílico. En otro aspecto,
- 45 los conectores pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos. En ciertos aspectos, los aminoácidos del conector son secuencias de aminoácidos adicionales del receptor de TGFβ tipo II o tipo III. En otros aspectos, los conectores no son secuencias de aminoácidos del receptor de TGFβ tipo II o tipo III, es decir, conectores heterólogos.

- 50 En ciertos aspectos, el segmento amino terminal comprende una secuencia de aminoácidos que es el 85, 90, 95, 98, o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:3, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos.

- En otro aspecto, el segmento central comprende una secuencia de aminoácidos que es el 85, 90, 95, 98, o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:4, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos.

- 55 En otro aspecto adicional, el segmento carboxilo terminal comprende una secuencia de aminoácidos que es el 85, 90, 95, 98, o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:5, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos.

- En ciertos aspectos, la proteína de fusión tienen una secuencia de aminoácidos que es el 85, 90, 95, 98, o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:2, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos.

- 60

En otro aspecto, la proteína de fusión puede comprender además una secuencia señal en el extremo amino terminal. En ciertos aspectos, la proteína de fusión puede comprender además una etiqueta en el extremo amino terminal o carboxilo terminal. En ciertos aspectos la etiqueta es hexa-histidina.

5

Una etiqueta peptídica como se usa en esta invención se refiere a una secuencia de péptidos que está unida (por ejemplo mediante ingeniería genética) a otro péptido o una proteína, para proporcionar una función a la fusión resultante. Las etiquetas peptídicas suelen ser relativamente cortas en comparación a una proteína a la que se fusionan, a modo de ejemplo, las etiquetas peptídicas son cuatro o más aminoácidos de longitud, como por ejemplo,

10

5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, o 25 o más aminoácidos. Normalmente una etiqueta peptídica no será de más de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, y puede no ser más de aproximadamente 75, no más que aproximadamente 50, no más que aproximadamente 40, o no más que aproximadamente 30.

Las etiquetas peptídicas confieren una o más funciones diferentes a una proteína de fusión (por lo tanto

15

20

"funcionalizan" esa proteína), y dichas funciones pueden incluir (pero no se limitan a) uniones de anticuerpos (una etiqueta de epítipo), purificación, translocación, dianas dirigidas y diferenciación (p. ej. a partir de una proteína nativa). Además, se puede usar como una etiqueta de epítipo específicamente escindible, un sitio de reconocimiento para una proteasa, para la que se conoce un anticuerpo de unión. El uso de dicha etiqueta escindible puede proporcionar escisiones y activaciones selectivas de una proteína. Alternativamente el sistema que

25

se desarrolló en el laboratorio Dowdy (Vocero-Akbani y cols., Nat Med. 5:29-33, 1999) se puede usar para proporcionar la especificidad de dicha escisión y activación.

Se puede lograr la detección de la molécula etiquetada usando distintas técnicas. Entre estas se incluyen: inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, citometría de flujo, microscopía inmunofluorescencia, ELISA,

30

inmunotransferencia ("western"), cromatografía de afinidad.

Las etiquetas de epítipo añaden un epítipo conocido (sitio de unión del anticuerpo) en la proteína sujeto, para proporcionar uniones de un anticuerpo conocido y a menudo de alta afinidad, y por lo tanto permitiendo que uno identifique y localice específicamente la proteína etiquetada que se ha añadido a un organismo vivo o la las células

35

40

cultivadas. Entre los ejemplos de las etiquetas de epítipo se incluyen las etiquetas myc, T7, GST, GFP, HA (hemaglutinina) y FLAG. Los primeros cuatro ejemplo son epítopos derivados de moléculas existentes. En contraste, FLAG es una etiqueta de epítipo sintética diseñada la alta antigenicidad (véase, p. ej., la patente de los EE.UU. N.º 4.703.004 y 4.851.341).

45

50

La etiquetas de purificación se usan para permitir una fácil purificación de la proteína etiquetada, como por ejemplo por cromatografía de afinidad. Una etiqueta de purificación muy conocida es la etiqueta hexa-histidina (6x-His), que es literalmente una secuencia de seis residuos de histidina. El sistema de purificación de la proteína 6x-His está comercialmente disponible por QIAGEN (Valencia, Calif.), bajo el nombre de QIAexpress®.

Ciertas formas de realización están dirigidas al uso terapéutico de las proteínas de fusión descritas en esta invención. Ciertos aspectos están dirigidos a un procedimiento para tratar una afección relacionada con el TGFβ que comprende la administración de una cantidad eficaz de una proteína de fusión descrito en esta invención. La proteína de fusión se puede administrar a un sujeto, como por ejemplo un mamífero. El mamífero que recibe tratamiento puede tener o puede estar en riesgo de tener una o más afecciones asociadas con un exceso de TGF-β

para la que se recomienda una reducción en los niveles de TGF-β. Dichas afecciones incluyen, pero no se limitan a, enfermedades fibróticas (como por ejemplo glomerulonefritis, fibrosis neuronal, fibrosis dérmica, fibrosis pulmonar (p. ej. fibrosis pulmonar idiopática), fibrosis de pulmón, fibrosis inducida por radiación, fibrosis hepática, mielofibrosis), adherencias pleurales, enfermedades hiperproliferativas (p.ej. cáncer), quemaduras, enfermedades inmunológicas, enfermedades inflamatorias (incluyendo artritis reumatoide), rechazo al trasplante, contractura de Dupuytren, y

úlceras gástricas. En ciertos aspectos la proteína de fusión se administra intravascularmente.

Entre otros términos relacionados con la descripción proporcionada en esta invención se incluyen:

El término "receptor" denota una proteína asociada a la célula que se une a una molécula bioactiva (es decir, un

55

ligando) y mitiga el efecto del ligando en la célula. Los receptores unidos a la membrana se caracterizan por una estructura de dominio múltiple que comprende un dominio de unión de ligando extracelular y un dominio efector intracelular que está típicamente implicado en la transducción de la señal.

Por "multimérico" o "heteromultimérico" se entiende que comprende dos o más subunidades diferentes. Un receptor

60

"heterodimérico" contiene dos subunidades distintas, donde una molécula "heterotrimérica" comprende tres

subunidades.

Por receptor multimérico "soluble" se entiende en esta invención un receptor multimérico, comprendiendo cada una de sus subunidades parcial o totalmente el dominio extracelular de un receptor, pero careciendo parcial o totalmente de cualquier dominio transmembrana, y careciendo parcial o totalmente de cualquier dominio intracelular. En general, un receptor soluble de la invención es soluble en una solución acuosa.

Una proteína de "fusión" es una proteína que comprende dos segmentos de polipéptido unidos por una unión de péptidos, p. ej., por procesos recombinantes.

Como se usa en esta invención, un polipéptido "variante" de un polipéptido parental o de tipo salvaje, contiene una o más sustituciones, supresiones y/o adiciones de aminoácidos en comparación con uno parental o de tipo salvaje. Típicamente, dichas variantes tienen una identidad de secuencia para la secuencia parental o de tipo salvaje de al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, y tiene propiedades conservadas o mejoradas en comparación con el polipéptido parental o de tipo salvaje. Algunos cambios pueden no afectar significativamente el plegamiento o actividad de la proteína o polipéptido, las sustituciones conservadoras de aminoácidos, como son bien conocidas en la técnica, cambiando un aminoácido a otro que tiene una cadena lateral con propiedades fisicoquímicas similares (aminoácidos básicos: arginina, lisina e histidina; aminoácidos ácidos: ácido glutámico, y ácido aspártico; aminoácidos polares: glutamina y asparagina; aminoácidos hidrófobos: leucina, isoleucina y valina; aminoácidos aromáticos: fenilalanina, triptófano, tirosina; aminoácidos pequeños: glicina, alanina, serina, treonina, metionina), pequeñas supresiones, típicamente de uno hasta aproximadamente 30 aminoácidos, y extensiones terminales amino o carboxilo pequeñas, como por ejemplo un residuo de metionina amino terminal, un pequeño péptido conector de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una pequeña extensión que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad), como por ejemplo un tracto de polihistidina, proteína A (Nilsson y cols., EMBO 1985;14:1075 y ss; Nilsson y cols., Methods Enzymol. 1991; 198:3 y ss), glutathione S-transferase (Smith and Johnson, Gene 1988;67:31 y ss), u otro antígeno: epítipo o dominio de unión. Véase, en general Ford y cols., Protein Expression and Purification 1991;2:95-107. Las etiquetas de afinidad de la codificación del ADN están disponibles en los proveedores comerciales.

Las diferencias de secuencia o "identidad", en el contexto de las secuencias de aminoácidos, se pueden determinar mediante cualquier técnica adecuada, como por ejemplo (y como una selección adecuada en el contexto de esta invención) empleando un análisis de alineamiento Needleman-Wunsch (véase Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. (1970) 48:443-453), como se proporciona mediante el análisis con ALIGN 2.0 usando la matriz de puntuación BLOSUM50 con una penalización por espacio en blanco de -12 y una penalización por extensión de -2 (véase Myers and Miller, CABIOS (1989) 4:11-17 para la discusión sobre técnicas de alineamiento global incorporadas en el programa ALIGN). Hay disponible una copia del programa ALIGN 2.0, p. ej. a través del San Diego Supercomputer (SDSC) Biology Workbench. Debido a que el alineamiento Needleman-Wunsch proporciona una medición de identidad general o global entre dos secuencias, se debe reconocer que las secuencias diana que pueden ser parte o subsecuencias de las secuencias peptídicas grandes se pueden usar de forma análoga para completar secuencias o, alternativamente, se pueden usar valores de alineación locales para evaluar las relaciones entre las subsecuencias, tal como determina, p. ej., el alineamiento Smith-Waterman (J. Mol. Biol. (1981) 147:195-197), que pueden obtenerse a través de programas disponibles (otros procedimientos de alineamiento locales que pueden ser adecuados para analizar la identidad incluyen programas que aplican algoritmos de alineamiento locales heurísticos como por ejemplo los programas FastA y BLAST).

El término "aislado" puede referirse a un ácido nucleico o polipéptido que carece sustancialmente de material celular, material bacteriano, material viral o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante) de su fuente de origen, o precursores químicos u otros químicos (cuando se sintetizan químicamente). Además, un compuesto aislado se refiere a uno que se puede administrar a un sujeto como un compuesto aislado, en otras palabras, el compuesto puede no considerarse simplemente "aislado" si está adherido a una columna o incrustado en un gel de agarosa. Además, un "fragmento de ácido nucleico aislado" o "péptido aislado" es un fragmento de ácido nucleico o proteína que no se produce naturalmente como un fragmento y/o no está típicamente en el estado funcional.

Los restos de la invención, como por ejemplo polipéptidos o péptidos pueden conjugarse o unirse covalentemente o no covalentemente a otros restos como por ejemplo polipéptidos, proteínas, péptidos, soportes, restos de fluorescencia, o etiquetas. El término "conjugado" se usa ampliamente para definir la asociación funcional de un resto con otro agente y no pretende referirse únicamente a cualquier tipo de asociación funcional, y no está particularmente limitada a la conjugación "química". Se contemplan particularmente las proteínas de fusión

recombinantes.

El término "proporcionar" se usa de acuerdo con este significado ordinario para indicar "suministrar o facilitar para su uso". En algunas formas de realización, se proporciona la proteína directamente administrando la proteína, mientras que en otras formas de realización, la proteína se proporciona eficazmente administrando un ácido nucleico que codifica la proteína. En ciertos aspectos la invención contempla composiciones que comprenden varias combinaciones de ácido nucleico, antígenos, péptidos, y/o epítomos.

Una cantidad eficaz se refiere a una cantidad de ingredientes activos necesarios para tratar, mejorar, o mitigar una enfermedad o una afección relacionada con una enfermedad. En aspectos más específicos, una cantidad eficaz impide, alivia, o mejora los síntomas de la enfermedad, o prolonga la supervivencia del sujeto tratado, o mejora la calidad de vida de un individuo. La determinación de una cantidad eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente en vista de la divulgación detallada proporcionada en esta invención. Para cualquier preparación usada en los procedimientos de la invención, se puede estimar inicialmente una cantidad eficaz o dosis de los estudios *in vitro*, cultivos celulares, y/o ensayos con modelos animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr una respuesta deseada o concentración de la proteína de fusión circulante. Dicha información se puede usar para determinar con precisión las dosis útiles en humanos.

A lo largo de esta solicitud se describen otras formas de realización de la invención. Una forma de realización descrita con respecto a un aspecto de la invención se aplica a otros aspectos de la invención y viceversa. Se entiende que cada forma de realización descrita en esta invención es una forma de realización de la invención que se aplica a todos los aspectos de la invención. Se contempla que cualquier forma de realización descrita en esta invención se puede implementar con respecto a cualquier procedimiento o composición de la invención, y viceversa. Además, las composiciones y kits de la invención se pueden usar para lograr procedimientos de la invención.

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno/a", pero también puede tener el significado de "uno/a o más", "al menos uno/a" y "uno/a o más que uno/a".

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o procedimiento que se emplea para determinar el valor.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para designar "y/o" a menos que se indique expresamente para referirse solo a alternativas o las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación admita una definición que se refiera solo a alternativas y a "y/o".

Como se usa en esta memoria descriptiva y reivindicación(ones), las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, como por ejemplo "comprender" y "comprendiendo"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, como por ejemplo "tener" y "tiene"), "incluyendo" (y cualquier forma de incluir, como por ejemplo "incluye" e "incluir") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como por ejemplo "contiene" y "contienen") son incluyentes o abiertas y no excluyen elementos no indicados o etapas procedimentales adicionales.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se debe entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, mientras que indican formas de realización específicas de la invención, se dan solo a modo de ilustración, ya que varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de la descripción detallada.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar aún más ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede comprender mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las formas de realización de la memoria descriptiva que se presenta en esta invención.

FIG. 1. Sensogramas de SPR en los que se inyectaron concentraciones crecientes de T β RII y T β RIII_E sobre una superficie del sensor de SPR con TGF- β 2 K25R I92V K94R inmovilizado. En los paneles a y b se muestran los sensogramas normalizados de masas, en el panel c se muestran los gráficos de la respuesta en equilibrio normalizada de masas (R_{eq}) en función de la concentración del receptor ([Receptor]), junto a los ajustes de $R_{eq} = (R_{max} \times [Receptor]) / (K_d + [Receptor])$.

FIG. 2. Sensogramas de SPR en los que se inyectaron concentraciones crecientes de ectodominio del receptor tipo II de TGF- β sobre TGF- β 2 K25R I92V K94R inmovilizado en ausencia (panel a) o presencia (panel b) de una concentración saturante (800 nM) del dominio de endoglina del receptor tipo III de TGF- β . En el panel c se muestran los gráficos de la respuesta en equilibrio normalizada de masas (R_{eq}) en función de la concentración del receptor ([Receptor]), junto a los ajustes de $R_{eq} = (R_{max} \times [Receptor]) / (K_d + [Receptor])$.

FIG. 3. Diagrama esquemático del complejo TGF β :T β RII con el dominio de endoglina del receptor tipo III de TGF β colocado de forma que no se solapa estéricamente con ninguna de las dos moléculas T β RII unidas. Se muestran las localizaciones en el T β RII de los extremos N y C terminales.

FIG. 4. Sensogramas de SPR en los que se inyectaron concentraciones crecientes de ER y RER sobre las superficies de la SPR con TGF- β 1, - β 2, y - β 3 inmovilizados. Las concentraciones del receptor inyectado oscilan de 10 nM hacia abajo (en incrementos de dos veces).

FIG. 5. Datos de la unión competitiva en SPR en los que se preincubaron concentraciones crecientes de T β RII (R), T β RIII_E-T β RII (ER), y T β RII-T β RIII_E-T β RII (RER) con TGF- β 3 0,8 nM durante 16 h y después se inyectaron sobre una superficie de SPR (20000 RU) de alta densidad con el anticuerpo monoclonal 1D11 anti TGF- β . Los datos se presentan en términos de pendiente inicial (que es directamente proporcional a la concentración de TGF- β libre en función de la concentración del competidor (R, ER, o RER). Se realizaron dos mediciones independientes para cada construcción del receptor estudiada (indicado por -a y -b es suficiente en la leyenda).

FIG. 6. CI₅₀ media usando células con Mv1Lu PAI1 luciferasa como indicador placas de 96 pocillos. Los ensayos se realizaron utilizando una dilución 4:1 de la fusión del receptor y 1D11 en serie (anticuerpo neutralizante) y el TGF- β 2 20 pM 1, 2, o 3, a 37° durante la noche.

FIG. 7A-7C. Curvas de neutralización que comparan varias retenciones (RR (RII-RII), RER (RII-BG_E-RII), ER (BG_E-RII), REU (RII-BG_E-BG_U, o alternativamente RII-RIII), o EU (BG_E-BG_U, o alternativamente RIII) y 1D11 para (A) TGF- β 1, (B) TGF- β 2, o TGF- β 3.

FIG. 8A-8C. Curvas de neutralización para varias preparaciones RER relacionadas con (A) de TGF- β 1, (B) TGF- β 2, o (c) TGF- β 3

DESCRIPCIÓN

Como se analiza anteriormente, las isoformas (β 1, β 2, y β 3) del factor del crecimiento transformante beta (TGF β) son polipéptidos homodiméricos de 25 kDa. TGF- β tiene nueve residuos de cisteína que se conservan entre su familia; ocho cisteínas forman cuatro uniones disulfuro en la molécula, tres de las cuales forman una estructura de nudo de cisteína característica de la superfamilia de TGF- β , mientras que la novena cisteína forma una unión disulfuro con la novena cisteína de otra molécula TGF- β para producir el dímero.

Aunque se ha informado de varios inhibidores de TGF- β , no se ha aprobado ninguno para uso clínico. El nuevo inhibidor de TGF- β descrito en esta invención, RER, se puede producir fusionando artificialmente los dominios de unión del receptor de TGF β tipo II y el dominio de endoglina del receptor tipo III. El diseño de RER, una fusión heterotrimérica en la que el ectodominio del receptor tipo II de TGF- β (R) se ha fusionado artificialmente en los extremos N y C terminales del dominio tipo endoglina del receptor tipo III de TGF- β (E), se concibió basándose en las estructuras de la unión de los TGF- β a sus receptores de señalización, T β RI y T β RII, y los resultados de los estudios de unión la resonancia de plasmón superficial (SPR) que mostraron que:

1. El dominio de endoglina del receptor tipo III de TGF- β se une a los dímeros de TGF- β con una estequiometría de 1:1. Esto se demostró comparando la respuesta de la SPR normalizada de masas máxima ya que las concentraciones crecientes del ectodominio del receptor tipo II de TGF- β (T β RII o R) el dominio tipo endoglina del receptor tipo III de TGF- β (T β RIII_E o E) se inyectaron sobre el TGF- β 2 K25R I92V K94R inmovilizado, una variante de TGF- β 2 que une T β RII con afinidad alta (FIG. 1A y 1B) (De Crescenzo y cols. J Mol Biol. 355, 47-62, 2006; Baardsnes y cols. Biochemistry 48, 2146-55, 2009). La respuesta normalizada de masas máxima para T β RIII_E fue de aproximadamente la mitad de esto para T β RII, permitiendo a los autores de la invención inferir que T β RIII_E debe unirse al dímero de TGF- β con estequiometría de 1:1 dado que es un hecho bien caracterizado a través de los estudios estructurales que T β RII se une a los dímeros de TGF- β con estequiometría 2:1 (FIG. 1C) (Hart y cols., Nat Struct Biol. 9, 203-8, 2002; Groppe y cols., Mol Cell 29, 157-68, 2008; Radaev y cols., Journal of Biological Chemistry 285, 14806-14, 2010).

2. T β RIII_E se une a los dímeros de TGF- β sin desplazar ninguno de los dos T β RII unidos. Esto se demostró realizando un experimento con la SPR en el que se inyectaron concentraciones aumentadas de T β RII sobre TGF- β 2 K25R I92V K94R inmovilizado en ausencia o presencia de una concentración saturante de T β RIII_E (800 nM) (FIG. 2A y 2B). Los datos mostraron que la respuesta de unión normalizada de masas máxima para T β RII aumentó ligeramente en presencia de T β RIII_E 800 nM (FIG. 2C), mostrando que los dos receptores no compiten el uno con el otro para unir el TGF- β (es imposible para más de dos T β RII unir el dímero de TGF- β y, por lo tanto, el aumento en la amplitud máxima está probablemente causado por un artefacto experimental, como por ejemplo una discrepancia en las concentraciones de T β RIII_E en las muestras de T β RII que se inyectaron y en el tampón).
- 10 En conjunto, estas observaciones sugieren que los dímeros de TGF- β son capaces de formar un complejo heterotrimérico en el que cada dímero de TGF- β se une a dos moléculas de T β RII y a una molécula de T β RIII_E. Se ha informado de que la estructura de TGF- β se une a T β RII (Hart y cols., Nat Struct Biol. 9, 203-8, 2002; Groppe y cols., Mol Cell 29, 157-68, 2008; Radaev y cols., Journal of Biological Chemistry 285, 14806-14, 2010), pero la
- 15 estructura de T β RIII_E, sola o unida a TGF- β , no. Esto a llevado a la estructura híbrida a donde la estructura precisa de T β RIII_E no es conocida, pero se conoce su posición global entre los dos T β RII unidos en el extremo distal del dímero de TGF- β (FIG. 3).
- Este modelo híbrido para unir T β RII y T β RIII_E llevó a la construcción de la fusión RER (T β RII-T β RIII_E-T β RII)
- 20 heterotrimérica como un nuevo inhibidor para unir y capturar TGF- β . La inclusión de dominio de unión adicional mejora la afinidad de la fusión de TGF- β , especialmente de TGF- β 1 y TGF- β 3, que se unen a T β RII con afinidad alta ($K_d \sim 120$ nM) (Baardsnes y cols. Biochemistry 48, 2146-55, 2009; Radaev y cols., Journal of Biological Chemistry 285, 14806-14, 2010).
- 25 En comparación con el RER descrito actualmente, el anticuerpo monoclonal GC1008 de Genzyme (la versión humanizada del anticuerpo monoclonal 1D11 de ratones) ha demostrado unir las tres isoformas de TGF- β con un K_d de aproximadamente 5 - 10 nM (Grütter, y cols., PNAS U.S.A. 105(51): 20251-56, 2008), pero no ha demostrado ser muy eficaz en los ensayos clínicos del melanoma maligno y del carcinoma de células renales. La razón de la falta de eficacia podría ser que GC1008 no se une fuertemente a los TGF- β para competir con los receptores de TGF- β de la
- 30 superficie celular, que une los TGF- β a concentraciones de picomolares a sub-picomolares.
- Los polipéptidos descritos en esta invención incluyen inhibidores de TGF- β heterotriméricos, como por ejemplo RER. Como se describe anteriormente RER ha demostrado unirse a las tres isoformas de TGF- β con baja afinidad nanomolar a afinidad sub-nanomolar. RER es más potente que el anticuerpo monoclonal 1D11. Por lo tanto, debido
- 35 a su afinidad mejorada para unir TGF- β , RER compite más eficazmente con los receptores de superficie celular para unir TGF- β , y a la vez bloquear sus propiedades de empeoramiento de enfermedades en, por ejemplo, el cáncer y la fibrosis.
- Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos RER (por ejemplo véase la SEQ ID NO:2) tiene uno o más de las
- 40 siguientes características:
1. En ciertos aspectos la secuencia de T β RII es humana (SEQ ID NO:6), mientras que la secuencia de T β RIII_E puede ser de rata (SEQ ID NO:7). En ciertos aspectos la secuencia de T β RIII_E puede ser humana (SEQ ID NO:8).
 2. En ciertas formas de realización la secuencia de T β RII del extremo N terminal de RER se extiende desde el
 - 45 residuo 42-160 de la SEQ ID NO:6, mientras que la secuencia T β RII del extremo C terminal de RER se extiende desde el residuo 48 - 160 de la SEQ ID NO:6.
 3. En ciertas formas de realización la secuencia T β RIII_E se extiende desde el residuo 24 - 383 de la SEQ ID NO:7. En ciertos aspectos, la secuencia T β RIII_E incluye 1, 2, 3, y/o 4 sustituciones simples de aminoácidos relativas a la secuencia de tipo salvaje de ratas (SEQ ID NO:7), R58H, H116R, C278S, y N337A.
 - 50 4. En ciertas formas de realización no hay conector entre T β RIII_E y el dominio T β RII del extremo C terminal. En otros aspectos el dipéptido Lys-Leu codificado por el sitio de restricción HindIII usado para unir los correspondientes fragmentos de ADN forman juntos un conector. Se contempla que se puede usar cualquier dipéptido.
 5. En ciertas formas de realización hay un conector de 18 aminoácidos con la secuencia Gly-Leu-Gly-Pro-Val-Glu-Ser-Ser-Pro-Gly-His-Gly-Leu-Asp-Thr-Ala-Ala-Ala (SEQ ID NO:9) que une el extremo C terminal de T β RII del
 - 55 extremo N terminal al T β RIII_E del extremo N terminal.
 6. En ciertas formas de realización hay una etiqueta hexa-histidina del extremo C terminal (para propósitos de purificación).

En un ejemplo, se insertó un casete de expresión RER en dirección amino del péptido señal de albúmina y un sitio de clonación NotI con la secuencia: Met-Lys-Trp-Val-Thr-Phe-Leu-Leu-Leu-Phe-Ile-Ser-Gly-Ser-Ala-Phe-Ser-

60

Ala-Ala-Ala (SEQ ID NO:10). Como se describió anteriormente, todo el péptido señal de albuminase se situó dirección amino del promotor CMV en una forma modificada de pcDNA3.1 (Invitrogen) (Zou and Sun, Cell 134, 215-30, 2004).

- 5 Se transfectó un plásmido que expresa la construcción RER en células CHO Lec 3.2.8.1 (Rosenwald y cols., Mol Cell Biol. 9(3):914-24, 1989) y se seleccionaron los transfectantes estables usando MSX (Zou and Sun, Cell 134, 215-30, 2004). A su vez, los transfectantes estables se analizaron para la expresión de la fusión RER examinando el medio acondicionado usando un anticuerpo policlonal expuesto a ectodominio betaglicano de ratas. Se creció el clon que expresa RER al máximo nivel y finalmente transfirió a un medio sin suero para la producción de medio
10 acondicionado. Después, se purificó el RER para el medio acondicionado pasándolo a través de una columna NiNTA, lavándolo con Tris de 25 mM, NaCl 100 mM, e imidazol 10 mM, pH 8 y finalmente se eluyó con el mismo tampón, pero con imidazol 300 mM.

- A su vez, la proteína de fusión de RER aislada se caracterizó mediante un experimento de SPR en el que, junto con
15 el ER preparado de forma similar (es decir la fusión de T β RIII_E-T β RII descrita previamente (Verona y cols., Protein Eng Des Sel. 21, 463-73, 2008), excepto que se produjo en células CHO, no en bacterias), se inyectó sobre un chip del sensor de la SPR con TGF- β 1, - β 2, y - β 3 inmovilizado. Estos datos mostraron velocidades de asociación comparables, pero velocidades de disociación significativamente menores, especialmente para TGF- β 1 y TGF- β 3 (FIG. 4). Esto muestra cualitativamente que RER une los TGF- β con mayor afinidad que ER; sin embargo, la
20 magnitud de este aumento resultó ser difícil de cuantificar ya que la lenta asociación impide medir con precisión la respuesta de la SPR del equilibrio, especialmente a bajas concentraciones del receptor inyectado.

- Para evaluar más la afinidad, se realizó un experimento de SPR, en el que el anticuerpo monoclonal 1D11 anti TGF- β disponible comercialmente (R&D Systems) se acopló a un chip del sensor de la SPR a alta densidad (20000 RU) y
25 a su vez se inyectó una concentración creciente de R (T β RII), ER (BG_E-RII), o RER (RII-BG_E-RII) en presencia de una concentración fija baja (0,8 nM) de TGF- β 3. La pendiente inicial de estos sensogramas (que es una función lineal de la concentración de TGF- β 3 libre) se representa gráficamente en función de la concentración de la fusión del receptor (FIG. 5). Esto mostró que RER es realmente un competidor más potente que ER, de acuerdo con la menor tasa de disociación para RER en comparación con ER.

- 30 Los polipéptidos de RER demuestran una actividad más potente respecto a las proteínas de fusión similares. Por ejemplo la CI₅₀ media [nM] usando células con Mv1Lu PAI1 luciferasa como indicador placas de 96 pocillos es muy inferior a los polipéptidos de RER (FIG. 6). Las curvas de neutralización que comparan varias fusiones de receptores (RR (RII-RII, también conocidos como T22d35), RER (RII-BG_E-RII), ER (BG_E-RII), REU (RII-BG_E-BG_U o
35 alternativamente RII-RIII), o EU (BG_E-BG_U o alternativamente RIII) y 1D11 para (A) TGF- β 1, (B) TGF- β 2, o TGF- β 3 también muestran una mayor actividad de los polipéptidos de RER (FIG. 7 y FIG. 8).

I. Conectores

- 40 En algunas formas de realización, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende tres dominios de unión de TGF- β unidos entre ellos directamente o mediante un conector, como p. ej. un péptido conector corto. En algunas formas de realización, el extremo C terminal del segmento de unión a TGF- β amino terminal está unido a través de un péptido conector al extremo N terminal del segmento de unión a TGF- β central, y el extremo C terminal del segmento de unión a TGF β central puede unirse al extremo N terminal del segmento de unión a TGF- β del
45 extremo carboxilo mediante un segundo conector. Un conector se considera corto si contiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 hasta 50 o menos aminoácidos.

- Más típicamente el conector es un péptido conector que contiene 50 o menos aminoácidos, p. ej., 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 3, 4, 2, o 1 aminoácido(s). En ciertos aspectos, la secuencia del péptido conector es una
50 secuencia aminoacídica de un receptor diferente a los TGF- β tipo II o tipo III. En otros aspectos, la secuencia del péptido conector es una secuencia de aminoácidos del receptor tipo II o tipo III de TGF- β adicional, p. ej. los 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, hasta 50 o menos aminoácidos flanquean los extremos terminales amino de los dominios de unión. El término adicional en este contexto se refiere a los aminoácidos además de aquellos que definen los segmentos del polipéptido heterotrimérico como se define anteriormente. En
55 varias formas de realización, el conector no contiene más de 50, 40, 20, 10, o 5 aminoácidos contiguos de las secuencias del receptor nativo. Típicamente, el conector será flexible y permitirá el correcto plegamiento de los dominios unidos. Normalmente se prefieren los aminoácidos que no tienen cadenas laterales voluminosas y grupos cargados (p. ej. glicina, serina, alanina y treonina). Opcionalmente, el conector puede contener adicionalmente uno o más aminoácidos adaptadores, como por ejemplo, aquellos producidos como resultado de la inserción de sitios de
60 restricción. Generalmente, no habrá más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 aminoácidos adaptadores en un conector.

En algunas formas de realización, el conector comprende una o más glicinas, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18, o más glicinas. Por ejemplo, el conector puede consistir en (GGG)_n, donde $n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$, etc. y aminoácidos adaptadores opcionales. En ciertos aspectos, el conector es un conector de glicina-serina que comprende (GGGS)_n, donde $n = 1, 2, 3, 4, 5$, etc. En vista de los resultados desvelados en esta invención, los expertos en la materia reconocerán que para las proteínas de fusión de la invención se puede usar cualquier otro péptido conector adecuado, por ejemplo, los descritos en Alfthan y cols., Protein Eng. 8:725-31, 1995; Argos, J. Mol. Biol. 211:943-58, 1990; Crasto y cols., Protein Eng., 13:309-12, 2000; Robinson y cols., PNAS USA, 95:5929-34, 1998.

II. Ácidos nucleicos, vectores y célula huésped

La invención proporciona además ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las proteínas de fusión de la invención, vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, y célula huésped que comprenden dichos ácidos nucleicos. Por ejemplo, en una forma de realización ilustrativa, el ácido nucleico de la invención comprende la secuencia como se expone en SEQ ID NO:1.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden incorporar en un vector, p. ej. un vector de expresión, usando técnicas estándar. Después, el vector de expresión puede introducirse en las células huésped usando una variedad de técnicas estándar como por ejemplo la transfección liposómica, la precipitación con fosfato de calcio, o electroporación. De acuerdo con la presente invención, las células huésped pueden ser células de mamífero, por ejemplo, células de ovario de hámster chino, célula de riñón embrionario humano (p.ej., HEK 293), células HeLa S3, células derivadas de embriones murinos, o células NSO. Sin embargo, también se pueden usar células no derivadas de mamíferos, incluyendo, p.ej. bacterias, levaduras, insectos, y células vegetales. Las células huésped adecuadas también pueden residir *in vivo*, en cuyo caso se pueden usar los ácidos nucleicos en el contexto de terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

III. Procedimientos de realización

La invención proporciona además procedimientos para producir (a) proteínas de fusión, (b) ácidos nucleicos que codifican las mismas, y (c) célula huésped y composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión o los ácidos nucleicos. Por ejemplo, un procedimiento para producir la proteína de fusión de acuerdo a la invención comprende cultivar una célula huésped, que contiene un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención bajo condiciones que resultan en la expresión de la proteína de fusión y la subsiguiente recuperación de la proteína de fusión. En otro aspecto, la proteína de fusión se expresa en células CHO o HEK 293 y se purifica a partir del medio usando procedimientos conocidos en la técnica. En algunas formas de realización, la proteína de fusión se eluye a partir de una columna con un pH neutro o superior, p. ej., pH 7,5 o superior, pH 8,0 o superior, pH 8,5 o superior, o pH 9,0 o superior.

Las proteínas de fusión, incluyendo las variantes, así como ácidos nucleicos que codifican las mismas, pueden fabricarse usando cualquier procedimiento adecuado, incluyendo técnicas de biología molecular estándares y procedimientos sintéticos, por ejemplo, los descritos en las siguientes referencias: Maniatis (1990) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, y Bodansky y cols. (1995) The Practice of Peptide Synthesis, 2nd ed., Springer Verlag, Berlin, Germany). Las composiciones farmacéuticas además pueden fabricarse usando cualquier procedimiento adecuado, incluyendo por ejemplo, los descritos en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, eds. Gennado y cols., 21th ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2005).

IV. Composiciones farmacéuticas y procedimientos de administración

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión de la invención o los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión.

La proteína de fusión podrá entregarse a una célula u organismo por medio de terapia génica, donde una secuencia del ácido nucleico que codifica la proteína de fusión se inserta en un vector de expresión que se administra *in vivo* o a células *ex vivo*, que después se administran *in vivo*, y la proteína de fusión se expresa posteriormente. Los procedimientos de terapia génica para entregar antagonistas de TGF- β son conocidos (véase, p. ej., Fakhrai y cols., PNAS USA, 93:2909-14, 1996 y la patente de EE. UU. 5,824,655).

La proteína de fusión puede administrarse a una célula u organismo en una composición farmacéutica que

comprende la proteína de fusión como un principio activo. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular dependiendo del tratamiento a efectuar y de la ruta de administración. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, por instilación intranasal, instilación intravesical o intracavitaria, intraocular, intraarterial, intralesional, o por aplicación de las membranas mucosas, como por ejemplo, las de la nariz, garganta, y bronquios. La composición farmacéutica comprenderá típicamente componentes biológicamente inactivos, como por ejemplo diluyentes, excipientes, sales, tampones, conservantes, etc. las técnicas de formulación farmacéutica estándares y los excipientes son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, p.ej., Physicians' Desk Reference (PDR) 2005, 59th ed., Medical Economics Company, 2004; y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, eds. Gennado y cols. 21th ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2005).

Generalmente, la proteína de fusión de la invención puede administrarse como una dosis de aproximadamente de 1 µg/kg hasta 25 mg/kg, dependiendo de la gravedad de los síntomas y de la progresión de la enfermedad. Un médico tratante selecciona la dosis terapéuticamente eficaz de un antagonista y puede oscilar aproximadamente desde 1 µg/kg hasta 20 mg/kg, desde 1 µg/kg hasta 10 mg/kg, desde 1 µg/kg hasta 1 mg/kg, desde 10 µg/kg hasta 1 mg/kg, desde 10 µg/kg hasta 100 µg/kg, desde 100 µg hasta 1 mg/kg, y desde 500 µg/kg hasta 5 mg/kg. Las dosis obtenidas en un animal pueden adaptarse para usarse en otro animal, incluyendo humanos, usando factores de conversión conocidos en la técnica (véase, p. ej., Freireich y cols., Cancer Chemother. Reports, 50(4):219-244 (1996)).

V. Usos Terapéuticos y no terapéuticos

Las proteínas de fusión de la invención se pueden usar para capturar o neutralizar TGF-β, por lo tanto reducir o impedir la unión de TGF-β que se produce de forma espontánea en los receptores de TGF-β.

La invención incluye un procedimiento para tratar a un sujeto (p. ej. mamífero) administrando al mamífero una proteína de fusión descrita en esta invención o un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión o células que contienen un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión. El mamífero puede ser, por ejemplo, primate (p. ej. humano), roedor (p. ej. ratón, cobaya, rata), u otros (como p. ej. perro, cerdo, conejo).

El mamífero que recibe tratamiento puede tener o puede estar en riesgo de tener una o más afecciones asociadas con un exceso de TGF-β para la que se recomienda una reducción en los niveles de TGF-β. Dichas afecciones incluyen, pero no se limitan a, enfermedades fibróticas (como por ejemplo glomerulonefritis, fibrosis neuronal, fibrosis dérmica, fibrosis pulmonar (p. ej. fibrosis pulmonar idiopática), fibrosis de pulmón, fibrosis inducida por radiación, fibrosis hepática, mielofibrosis), adherencias pleurales, enfermedades hiperproliferativas (p.ej. cáncer), quemaduras, enfermedades inmunológicas, enfermedades inflamatorias (incluyendo artritis reumatoide), rechazo al trasplante, contractura de Dupuytren, y úlceras gástricas.

En ciertas formas de realización, las proteínas de fusión, los ácidos nucleicos, y las células de la invención se usan para tratar enfermedades y afecciones asociadas con la deposición de la matriz extracelular (ECM). Dichas enfermedades y afecciones incluyen, pero no se limitan a, esclerosis sistémica, adherencias postoperatorias, cicatrización hipertrófica o queloide, vitreorretinopatía proliferativa, cirugía de drenaje del glaucoma, lesión corneal, cataratas, enfermedad de Peyronie, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, cirrosis biliar, cicatrización posterior al infarto de miocardio, restenosis (p. ej. restenosis posterior a la angioplastia), cicatrización después de hemorragia subaracnoidea, esclerosis múltiple, fibrosis después de laminectomía, fibrosis después de reparaciones de tendón y otras, cicatrización debido a eliminación de tatuaje, cirrosis biliar (incluyendo colangitis esclerosante), pericarditis, pleuresía, traqueostomía, lesión penetrante del CNS, síndrome miálgico eosinofílico, restenosis vascular, enfermedad veno-oclusiva, pancreatitis y artropatía psoriásica. En particular, las proteínas de fusión, y los aspectos relacionados de la invención son particularmente útiles para el tratamiento de fibrosis peritoneal y adherencias. Es bien conocido que los anticuerpos se transfieren fácilmente desde la cavidad peritoneal a la circulación. Por lo tanto, la administración intraperitoneal de la proteína de fusión puede proporcionar una forma altamente localizada de tratamiento de los trastornos peritoneales como la fibrosis peritoneal y las adherencias debido a la concentración ventajosa de la proteína de fusión dentro del peritoneo afectado.

Las proteínas de fusión, los ácidos nucleicos, y las células de la invención son además útiles para tratar afecciones donde el favorecimiento de la reepitelización es beneficiosa. Dichas afecciones incluyen, pero no se limitan a: enfermedades de la piel, como úlceras venosas, úlceras isquémicas (llagas por presión), úlceras diabéticas, zonas de injertos, zonas de injertos en donantes, abrasiones y quemaduras; enfermedades del epitelio bronquial, como por ejemplo asma y ARDS, enfermedades del epitelio intestinal, como por ejemplo mucositis asociada con el tratamiento citotóxico, úlceras estomacales, y lesiones del intestino delgado y grueso (enfermedad inflamatoria intestinal).

Otros usos adicionales de las proteínas de fusión, los ácidos nucleicos, y las células de la invención son en afecciones en las que se desea la proliferación de las células endoteliales, por ejemplo, en la estabilización de placas ateroscleróticas, favoreciendo la curación de las anastomosis vasculares, o en afecciones en las que se desea la inhibición de la proliferación de las células de músculo liso vascular, como por ejemplo enfermedad arterial, restenosis y asma.

Las proteínas de fusión, los ácidos nucleicos, y las células de la invención son además útiles en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, como por ejemplo cánceres incluyendo, pero no limitado a, cánceres de mama, próstata, ovarios, estómago, renal (p. ej. carcinoma de células renales), pancreático, colorrectal, piel, pulmón, tiroideo, cervical y vejiga, glioma, glioblastoma, mesotelioma, melanoma, así como varias leucemias y sarcomas, como por ejemplo sarcoma de Kaposi, y en particular son útiles para tratar o impedir recurrencias o metástasis de dichos tumores. En formas de realización particulares, las proteínas de fusión, los ácidos nucleicos, y las células de la invención son útiles en procedimientos de inhibición de la metástasis mediada por ciclosporina. Por supuesto se apreciará que en el contexto de la terapia contra el cáncer, "tratamiento" incluye cualquier intervención médica que resulte en la ralentización del crecimiento del tumor o la reducción de la metástasis del tumor, así como una remisión parcial del cáncer para prolongar la esperanza de vida del paciente. En una forma de realización, la invención es un procedimiento para tratar el cáncer que comprende la administración de una proteína de fusión, ácido nucleico o células de la invención. En formas de realización particulares, la afección es cáncer renal, cáncer de próstata o melanoma.

Las proteínas de fusión, los ácidos nucleicos, y las células de la invención son además útiles para tratar, prevenir y reducir el riesgo de apariciones de insuficiencia renal, incluyendo, pero no limitadas a, nefropatía diabética (tipo I y tipo II), nefropatía por radiación, nefropatía obstructiva, esclerosis sistémica difusa, fibrosis pulmonar, rechazo del aloinjerto, enfermedad renal hereditaria (p. ej. poliquistosis renal, riñón esponjoso medular, riñón en herradura), nefritis, glomerulonefritis, nefroesclerosis, nefrocalcinosis, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, enfermedad de Berger, hipertensión sistémica o glomerular, nefropatía tubulointersticial, acidosis tubular renal, tuberculosis renal e infarto renal. En formas de realización particulares, las proteínas de fusión, ácidos nucleicos y células de la invención se combinan con antagonistas del sistema renina-angiotensina-aldosterona incluyendo, pero no limitado a, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), antagonistas de los receptores de Ang II (también conocidos como "bloqueantes del receptor de II") y antagonistas de aldosterona (véase, por ejemplo, WO 2004/098637).

Las proteínas de fusión, los ácidos nucleicos, y las células de la invención son además útiles para mejorar la respuesta inmunitaria a las infecciones macrofágicas, como por ejemplo las causadas por *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, así como el protozoo *Toxoplasma gondii*, los hongos *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, y *Cryptococcus neoformans*, y *Rickettsia*, por ejemplo, *R. prowazekii*, *R. coronii*, y *R. tsutsugamushi*. Son además útiles para reducir la inmunosupresión causada, por ejemplo, por tumores, SIDA o enfermedades granulomatosas.

Además, sin estar vinculado a ninguna teoría en particular, se cree además que puede que las proteínas de fusión de la invención, dado que carecen de un dominio de inmunoglobulina (a diferencia de las proteínas de fusión entre un anticuerpo anti TGF- β y el receptor TGF- β -proteínas de fusión Fc), no sean tan susceptibles a su eliminación de los sitios de acción mediante el sistema inmunitario (p. ej. en afecciones o enfermedades pulmonares).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> La Junta de Regentes de la Universidad de Texas System; Hinck, Andrew; Sun, LuZhe; Zwieb, Christian
 <120> Fusiones de receptores TGFbeta Tipo II-Tipo III
 <130> STTM0002WO
 <150> 61/616,740
 <151> 2012-03-28
 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 1893
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1893)
<400> 1

5

atg aag tgg gta acc ttt ctc ctc ctc ctc ttc atc tcc ggt tct gcc	48
Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala	
1 5 10 15	
ttt tct gcg gcc gct aac ggt gca gtc aag ttt cca caa ctg tgt aaa	96
Phe Ser Ala Ala Ala Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys	
20 25 30	
ttt tgt gat gtg aga ttt tcc acc tgt gac aac cag aaa tcc tgc atg	144
Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met	
35 40 45	
agc aac tgc agc atc acc tcc atc tgt gag aag cca cag gaa gtc tgt	192
Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys	
50 55 60	
gtg gct gta tgg aga aag aat gac gag aac ata aca cta gag aca gtt	240
Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val	
65 70 75 80	
tgc cat gac ccc aag ctc ccc tac cat gac ttt att ctg gaa gat gct	288
Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala	
85 90 95	
gct tct cca aag tgc att atg aag gaa aaa aaa aag cct ggt gag act	336
Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr	
100 105 110	
ttc ttc atg tgt tcc tgt agc tct gat gag tgc aat gac aac atc atc	384
Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile	
115 120 125	

ES 2 648 492 T3

ttc tca gaa gaa tat aac acc agc aat cct gac ggc ctt ggt cct gtg Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Leu Gly Pro Val 130 135 140	432
gaa tca tca cct ggc cat ggc ctg gac acg gcg gcc gct ggt cca gag Glu Ser Ser Pro Gly His Gly Leu Asp Thr Ala Ala Ala Gly Pro Glu 145 150 155 160	480
ccc agc acc cgg tgt gaa ctg tca cca atc aac gcc tct cac cca gtc Pro Ser Thr Arg Cys Glu Leu Ser Pro Ile Asn Ala Ser His Pro Val 165 170 175	528
cag gcc ttg atg gag agc ttc acc gtt ctg tct ggc tgt gcc agc cat Gln Ala Leu Met Glu Ser Phe Thr Val Leu Ser Gly Cys Ala Ser His 180 185 190	576
ggc acc acc ggg ctg cca agg gag gtc cat gtc cta aac ctc cga agt Gly Thr Thr Gly Leu Pro Arg Glu Val His Val Leu Asn Leu Arg Ser 195 200 205	624
aca gat cag gga cca ggc cag cgg cag aga gag gtt acc ctg cac ctg Thr Asp Gln Gly Pro Gly Gln Arg Gln Arg Glu Val Thr Leu His Leu 210 215 220	672
aac ccc att gcc tcg gtg cac act cac cac aaa ccc atc gtg ttc ctg Asn Pro Ile Ala Ser Val His Thr His His Lys Pro Ile Val Phe Leu 225 230 235 240	720
ctc aac tcc ccc cag ccc ctg gtg tgg cgt ctg aag acg gag aga ctg Leu Asn Ser Pro Gln Pro Leu Val Trp Arg Leu Lys Thr Glu Arg Leu 245 250 255	768
gcc gct ggt gtc ccc aga ctc ttc ctg gtt tca gag ggt tct gtg gtc Ala Ala Gly Val Pro Arg Leu Phe Leu Val Ser Glu Gly Ser Val Val 260 265 270	816
cag ttt cca tca gga aac ttc tcc ttg aca gca gaa aca gag gaa agg Gln Phe Pro Ser Gly Asn Phe Ser Leu Thr Ala Glu Thr Glu Glu Arg 275 280 285	864
aat ttc cct caa gaa aat gaa cat ctg ctg cgc tgg gcc caa aag gaa Asn Phe Pro Gln Glu Asn Glu His Leu Leu Arg Trp Ala Gln Lys Glu 290 295 300	912
tat gga gca gtg act tcg ttc acc gaa ctc aag ata gca aga aac atc Tyr Gly Ala Val Thr Ser Phe Thr Glu Leu Lys Ile Ala Arg Asn Ile 305 310 315 320	960
tat att aaa gtg gga gaa gat caa gtg ttt cct cct acg tgt aac ata Tyr Ile Lys Val Gly Glu Asp Gln Val Phe Pro Pro Thr Cys Asn Ile 325 330 335	1008
ggg aag aat ttc ctc tca ctc aat tac ctt gcc gag tac ctt caa ccc Gly Lys Asn Phe Leu Ser Leu Asn Tyr Leu Ala Glu Tyr Leu Gln Pro 340 345 350	1056
aaa gcc gcc gaa ggt tgt gtc ctg ccc agt caa ccc cat gaa aag gaa Lys Ala Ala Glu Gly Cys Val Leu Pro Ser Gln Pro His Glu Lys Glu 355 360 365	1104
gta cac atc atc gag tta att acc ccc agc tcg aac cct tac agc gct Val His Ile Ile Glu Leu Ile Thr Pro Ser Ser Asn Pro Tyr Ser Ala	1152

ES 2 648 492 T3

370	375	380	
ttc cag gtg gat ata ata gtt gac ata cga cct gct caa gag gat ccc			1200
Phe Gln Val Asp Ile Ile Val Asp Ile Arg Pro Ala Gln Glu Asp Pro			
385	390	395	400
gag gtg gtc aaa aac ctt gtc ctg atc ttg aag tcc aaa aag tct gtc			1248
Glu Val Val Lys Asn Leu Val Leu Ile Leu Lys Ser Lys Lys Ser Val			
	405	410	415
aac tgg gtg atc aag tct ttt gac gtc aag gga aac ttg aaa gtc att			1296
Asn Trp Val Ile Lys Ser Phe Asp Val Lys Gly Asn Leu Lys Val Ile			
	420	425	430
gct ccc aac agt atc ggc ttt gga aaa gag agt gaa cga tcc atg aca			1344
Ala Pro Asn Ser Ile Gly Phe Gly Lys Glu Ser Glu Arg Ser Met Thr			
	435	440	445
atg acc aaa ttg gta aga gat gac atc cct tcc acc caa gag aat ctg			1392
Met Thr Lys Leu Val Arg Asp Asp Ile Pro Ser Thr Gln Glu Asn Leu			
	450	455	460
atg aag tgg gca ctg gac gct ggc tac agg cca gtg acg tca tac aca			1440
Met Lys Trp Ala Leu Asp Ala Gly Tyr Arg Pro Val Thr Ser Tyr Thr			
	465	470	480
atg gct ccc gtg gct aat aga ttt cat ctt cgg ctt gag aac aac gag			1488
Met Ala Pro Val Ala Asn Arg Phe His Leu Arg Leu Glu Asn Asn Glu			
	485	490	495
gag atg aga gat gag gaa gtc cac acc att cct cct gag ctt cgt atc			1536
Glu Met Arg Asp Glu Glu Val His Thr Ile Pro Pro Glu Leu Arg Ile			
	500	505	510
ctg ctg gac cct gac aag ctt cca caa ctg tgt aaa ttt tgt gat gtg			1584
Leu Leu Asp Pro Asp Lys Leu Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val			
	515	520	525
aga ttt tcc acc tgt gac aac cag aaa tcc tgc atg agc aac tgc agc			1632
Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser			
	530	535	540
atc acc tcc atc tgt gag aag cca cag gaa gtc tgt gtg gct gta tgg			1680
Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp			
	545	550	555
aga aag aat gac gag aac ata aca cta gag aca gtt tgc cat gac ccc			1728
Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro			
	565	570	575
aag ctc ccc tac cat gac ttt att ctg gaa gat gct gct tct cca aag			1776
Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys			
	580	585	590
tgc att atg aag gaa aaa aaa aag cct ggt gag act ttc ttc atg tgt			1824
Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys			
	595	600	605
tcc tgt agc tct gat gag tgc aat gac aac atc atc ttc tca gaa gaa			1872
Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu			
	610	615	620
tat aac acc agc aat cct gac			1893
	Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp		
	625	630	

<210> 2
5 <211> 631

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5 <400> 2

```

Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala
1          5          10          15

Phe Ser Ala Ala Ala Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys
          20          25          30

Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met
          35          40          45

Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys
          50          55          60

Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val
65          70          75          80

Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala
          85          90          95

Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr
          100          105          110

Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile
          115          120          125

Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Leu Gly Pro Val
          130          135          140

Glu Ser Ser Pro Gly His Gly Leu Asp Thr Ala Ala Ala Gly Pro Glu
145          150          155          160

Pro Ser Thr Arg Cys Glu Leu Ser Pro Ile Asn Ala Ser His Pro Val
          165          170          175

Gln Ala Leu Met Glu Ser Phe Thr Val Leu Ser Gly Cys Ala Ser His
          180          185          190

Gly Thr Thr Gly Leu Pro Arg Glu Val His Val Leu Asn Leu Arg Ser

```

ES 2 648 492 T3

195					200					205					
Thr	Asp	Gln	Gly	Pro	Gly	Gln	Arg	Gln	Arg	Glu	Val	Thr	Leu	His	Leu
210						215				220					
Asn	Pro	Ile	Ala	Ser	Val	His	Thr	His	His	Lys	Pro	Ile	Val	Phe	Leu
225				230						235				240	
Leu	Asn	Ser	Pro	Gln	Pro	Leu	Val	Trp	Arg	Leu	Lys	Thr	Glu	Arg	Leu
				245				250						255	
Ala	Ala	Gly	Val	Pro	Arg	Leu	Phe	Leu	Val	Ser	Glu	Gly	Ser	Val	Val
		260						265						270	
Gln	Phe	Pro	Ser	Gly	Asn	Phe	Ser	Leu	Thr	Ala	Glu	Thr	Glu	Glu	Arg
		275				280						285			
Asn	Phe	Pro	Gln	Glu	Asn	Glu	His	Leu	Leu	Arg	Trp	Ala	Gln	Lys	Glu
290						295				300					
Tyr	Gly	Ala	Val	Thr	Ser	Phe	Thr	Glu	Leu	Lys	Ile	Ala	Arg	Asn	Ile
305				310						315				320	
Tyr	Ile	Lys	Val	Gly	Glu	Asp	Gln	Val	Phe	Pro	Pro	Thr	Cys	Asn	Ile
				325				330						335	
Gly	Lys	Asn	Phe	Leu	Ser	Leu	Asn	Tyr	Leu	Ala	Glu	Tyr	Leu	Gln	Pro
		340						345				350			
Lys	Ala	Ala	Glu	Gly	Cys	Val	Leu	Pro	Ser	Gln	Pro	His	Glu	Lys	Glu
		355				360						365			
Val	His	Ile	Ile	Glu	Leu	Ile	Thr	Pro	Ser	Ser	Asn	Pro	Tyr	Ser	Ala
370						375				380					
Phe	Gln	Val	Asp	Ile	Ile	Val	Asp	Ile	Arg	Pro	Ala	Gln	Glu	Asp	Pro
385				390						395				400	
Glu	Val	Val	Lys	Asn	Leu	Val	Leu	Ile	Leu	Lys	Ser	Lys	Lys	Ser	Val
				405				410						415	
Asn	Trp	Val	Ile	Lys	Ser	Phe	Asp	Val	Lys	Gly	Asn	Leu	Lys	Val	Ile
		420						425				430			
Ala	Pro	Asn	Ser	Ile	Gly	Phe	Gly	Lys	Glu	Ser	Glu	Arg	Ser	Met	Thr
		435				440						445			

ES 2 648 492 T3

Met Thr Lys Leu Val Arg Asp Asp Ile Pro Ser Thr Gln Glu Asn Leu
450 455 460

Met Lys Trp Ala Leu Asp Ala Gly Tyr Arg Pro Val Thr Ser Tyr Thr
465 470 475 480

Met Ala Pro Val Ala Asn Arg Phe His Leu Arg Leu Glu Asn Asn Glu
485 490 495

Glu Met Arg Asp Glu Glu Val His Thr Ile Pro Pro Glu Leu Arg Ile
500 505 510

Leu Leu Asp Pro Asp Lys Leu Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val
515 520 525

Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser
530 535 540

Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp
545 550 555 560

Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro
565 570 575

Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys
580 585 590

Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys
595 600 605

Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu
610 615 620

Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
625 630

<210> 3

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg
1 5 10 15

Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile
20 25 30

ES 2 648 492 T3

Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg
35 40 45

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

Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys
65 70 75 80

Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser
85 90 95

Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr
100 105 110

Asn Thr Ser Asn Pro Asp
115

<210> 4
<211> 360
5 <212> PRT
<213> Rattus norvegicus
<400> 4

Gly Pro Glu Pro Ser Thr Arg Cys Glu Leu Ser Pro Ile Asn Ala Ser
1 5 10 15

His Pro Val Gln Ala Leu Met Glu Ser Phe Thr Val Leu Ser Gly Cys
20 25 30

Ala Ser His Gly Thr Thr Gly Leu Pro Arg Glu Val His Val Leu Asn
35 40 45

Leu Arg Ser Thr Asp Gln Gly Pro Gly Gln Arg Gln Arg Glu Val Thr
50 55 60

Leu His Leu Asn Pro Ile Ala Ser Val His Thr His His Lys Pro Ile
65 70 75 80

Val Phe Leu Leu Asn Ser Pro Gln Pro Leu Val Trp Arg Leu Lys Thr
85 90 95

Glu Arg Leu Ala Ala Gly Val Pro Arg Leu Phe Leu Val Ser Glu Gly
100 105 110

Ser Val Val Gln Phe Pro Ser Gly Asn Phe Ser Leu Thr Ala Glu Thr
115 120 125

ES 2 648 492 T3

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

<210> 5
 <211> 112
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

ES 2 648 492 T3

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

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

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

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

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

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

Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
100 105 110

<210> 6

<211> 567

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val
20 25 30

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

Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln
50 55 60

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro
65 70 75 80

Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr
85 90 95

ES 2 648 492 T3

Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile
 100 105 110

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys
 115 120 125

Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn
 130 135 140

Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu
 165 170 175

Gly Val Ala Ile Ser Val Ile Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn
 180 185 190

Arg Gln Gln Lys Leu Ser Ser Thr Trp Glu Thr Gly Lys Thr Arg Lys
 195 200 205

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

Ser Asp Ile Ser Ser Thr Cys Ala Asn Asn Ile Asn His Asn Thr Glu
 225 230 235 240

Leu Leu Pro Ile Glu Leu Asp Thr Leu Val Gly Lys Gly Arg Phe Ala
 245 250 255

Glu Val Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Thr Ser Glu Gln Phe Glu
 260 265 270

Thr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Tyr Glu Glu Tyr Ala Ser Trp Lys
 275 280 285

Thr Glu Lys Asp Ile Phe Ser Asp Ile Asn Leu Lys His Glu Asn Ile
 290 295 300

Leu Gln Phe Leu Thr Ala Glu Glu Arg Lys Thr Glu Leu Gly Lys Gln
 305 310 315 320

Tyr Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Ala Lys Gly Asn Leu Gln Glu Tyr
 325 330 335

Leu Thr Arg His Val Ile Ser Trp Glu Asp Leu Arg Lys Leu Gly Ser
 340 345 350

ES 2 648 492 T3

Ser Leu Ala Arg Gly Ile Ala His Leu His Ser Asp His Thr Pro Cys
 355 360 365
 Gly Arg Pro Lys Met Pro Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn
 370 375 380
 Ile Leu Val Lys Asn Asp Leu Thr Cys Cys Leu Cys Asp Phe Gly Leu
 385 390 395 400
 Ser Leu Arg Leu Asp Pro Thr Leu Ser Val Asp Asp Leu Ala Asn Ser
 405 410 415
 Gly Gln Val Gly Thr Ala Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Glu Ser
 420 425 430
 Arg Met Asn Leu Glu Asn Val Glu Ser Phe Lys Gln Thr Asp Val Tyr
 435 440 445
 Ser Met Ala Leu Val Leu Trp Glu Met Thr Ser Arg Cys Asn Ala Val
 450 455 460
 Gly Glu Val Lys Asp Tyr Glu Pro Pro Phe Gly Ser Lys Val Arg Glu
 465 470 475 480
 His Pro Cys Val Glu Ser Met Lys Asp Asn Val Leu Arg Asp Arg Gly
 485 490 495
 Arg Pro Glu Ile Pro Ser Phe Trp Leu Asn His Gln Gly Ile Gln Met
 500 505 510
 Val Cys Glu Thr Leu Thr Glu Cys Trp Asp His Asp Pro Glu Ala Arg
 515 520 525
 Leu Thr Ala Gln Cys Val Ala Glu Arg Phe Ser Glu Leu Glu His Leu
 530 535 540
 Asp Arg Leu Ser Gly Arg Ser Cys Ser Glu Glu Lys Ile Pro Glu Asp
 545 550 555 560
 Gly Ser Leu Asn Thr Thr Lys
 565

<210> 7
 <211> 853
 5 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 7

ES 2 648 492 T3

Met Ala Val Thr Ser His His Met Ile Pro Val Met Val Val Leu Met
1 5 10 15

Ser Ala Cys Leu Ala Thr Ala Gly Pro Glu Pro Ser Thr Arg Cys Glu
20 25 30

Leu Ser Pro Ile Asn Ala Ser His Pro Val Gln Ala Leu Met Glu Ser
35 40 45

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

Arg Glu Val His Val Leu Asn Leu Arg Ser Thr Asp Gln Gly Pro Gly
65 70 75 80

Gln Arg Gln Arg Glu Val Thr Leu His Leu Asn Pro Ile Ala Ser Val
85 90 95

His Thr His His Lys Pro Ile Val Phe Leu Leu Asn Ser Pro Gln Pro
100 105 110

Leu Val Trp His Leu Lys Thr Glu Arg Leu Ala Ala Gly Val Pro Arg
115 120 125

Leu Phe Leu Val Ser Glu Gly Ser Val Val Gln Phe Pro Ser Gly Asn
130 135 140

Phe Ser Leu Thr Ala Glu Thr Glu Glu Arg Asn Phe Pro Gln Glu Asn
145 150 155 160

Glu His Leu Leu Arg Trp Ala Gln Lys Glu Tyr Gly Ala Val Thr Ser
165 170 175

Phe Thr Glu Leu Lys Ile Ala Arg Asn Ile Tyr Ile Lys Val Gly Glu
180 185 190

Asp Gln Val Phe Pro Pro Thr Cys Asn Ile Gly Lys Asn Phe Leu Ser
195 200 205

Leu Asn Tyr Leu Ala Glu Tyr Leu Gln Pro Lys Ala Ala Glu Gly Cys
210 215 220

Val Leu Pro Ser Gln Pro His Glu Lys Glu Val His Ile Ile Glu Leu
225 230 235 240

Ile Thr Pro Ser Ser Asn Pro Tyr Ser Ala Phe Gln Val Asp Ile Ile
245 250 255

ES 2 648 492 T3

Val Asp Ile Arg Pro Ala Gln Glu Asp Pro Glu Val Val Lys Asn Leu
 260 265 270
 Val Leu Ile Leu Lys Cys Lys Lys Ser Val Asn Trp Val Ile Lys Ser
 275 280 285
 Phe Asp Val Lys Gly Asn Leu Lys Val Ile Ala Pro Asn Ser Ile Gly
 290 295 300
 Phe Gly Lys Glu Ser Glu Arg Ser Met Thr Met Thr Lys Leu Val Arg
 305 310 315 320
 Asp Asp Ile Pro Ser Thr Gln Glu Asn Leu Met Lys Trp Ala Leu Asp
 325 330 335
 Asn Gly Tyr Arg Pro Val Thr Ser Tyr Thr Met Ala Pro Val Ala Asn
 340 345 350
 Arg Phe His Leu Arg Leu Glu Asn Asn Glu Glu Met Arg Asp Glu Glu
 355 360 365
 Val His Thr Ile Pro Pro Glu Leu Arg Ile Leu Leu Asp Pro Asp His
 370 375 380
 Pro Pro Ala Leu Asp Asn Pro Leu Phe Pro Gly Glu Gly Ser Pro Asn
 385 390 395 400
 Gly Gly Leu Pro Phe Pro Phe Pro Asp Ile Pro Arg Arg Gly Trp Lys
 405 410 415
 Glu Gly Glu Asp Arg Ile Pro Arg Pro Lys Gln Pro Ile Val Pro Ser
 420 425 430
 Val Gln Leu Leu Pro Asp His Arg Glu Pro Glu Glu Val Gln Gly Gly
 435 440 445
 Val Asp Ile Ala Leu Ser Val Lys Cys Asp His Glu Lys Met Val Val
 450 455 460
 Ala Val Asp Lys Asp Ser Phe Gln Thr Asn Gly Tyr Ser Gly Met Glu
 465 470 475 480
 Leu Thr Leu Leu Asp Pro Ser Cys Lys Ala Lys Met Asn Gly Thr His
 485 490 495
 Phe Val Leu Glu Ser Pro Leu Asn Gly Cys Gly Thr Arg His Arg Arg

ES 2 648 492 T3

500							505					510				
Ser	Thr	Pro	Asp	Gly	Val	Val	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ile	Val	Val	Gln	Ala	
		515					520					525				
Pro	Ser	Pro	Gly	Asp	Ser	Ser	Gly	Trp	Pro	Asp	Gly	Tyr	Glu	Asp	Leu	
	530					535					540					
Glu	Ser	Gly	Asp	Asn	Gly	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Glu	Gly	Glu	Thr	
545					550					555					560	
Ala	Pro	Leu	Ser	Arg	Ala	Gly	Val	Val	Val	Phe	Asn	Cys	Ser	Leu	Arg	
				565					570					575		
Gln	Leu	Arg	Asn	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Gly	Gln	Leu	Asp	Gly	Asn	Ala	
			580					585					590			
Thr	Phe	Asn	Met	Glu	Leu	Tyr	Asn	Thr	Asp	Leu	Phe	Leu	Val	Pro	Ser	
		595					600					605				
Pro	Gly	Val	Phe	Ser	Val	Ala	Glu	Asn	Glu	His	Val	Tyr	Val	Glu	Val	
	610					615					620					
Ser	Val	Thr	Lys	Ala	Asp	Gln	Asp	Leu	Gly	Phe	Ala	Ile	Gln	Thr	Cys	
625					630					635					640	
Phe	Leu	Ser	Pro	Tyr	Ser	Asn	Pro	Asp	Arg	Met	Ser	Asp	Tyr	Thr	Ile	
				645					650					655		
Ile	Glu	Asn	Ile	Cys	Pro	Lys	Asp	Asp	Ser	Val	Lys	Phe	Tyr	Ser	Ser	
			660					665					670			
Lys	Arg	Val	His	Phe	Pro	Ile	Pro	His	Ala	Glu	Val	Asp	Lys	Lys	Arg	
		675					680					685				
Phe	Ser	Phe	Leu	Phe	Lys	Ser	Val	Phe	Asn	Thr	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	
	690					695					700					
His	Cys	Glu	Leu	Thr	Leu	Cys	Ser	Arg	Lys	Lys	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	
705					710					715					720	
Pro	Arg	Cys	Val	Thr	Pro	Asp	Asp	Ala	Cys	Thr	Ser	Leu	Asp	Ala	Thr	
				725					730					735		
Met	Ile	Trp	Thr	Met	Met	Gln	Asn	Lys	Lys	Thr	Phe	Thr	Lys	Pro	Leu	
			740					745					750			

ES 2 648 492 T3

Ala Val Val Leu Gln Val Asp Tyr Lys Glu Asn Val Pro Ser Thr Lys
755 760 765

Asp Ser Ser Pro Ile Pro Pro Pro Pro Gln Ile Phe His Gly Leu
770 775 780

Asp Thr Leu Thr Val Met Gly Ile Ala Phe Ala Ala Phe Val Ile Gly
785 790 795 800

Ala Leu Leu Thr Gly Ala Leu Trp Tyr Ile Tyr Ser His Thr Gly Glu
805 810 815

Thr Ala Arg Arg Gln Gln Val Pro Thr Ser Pro Pro Ala Ser Glu Asn
820 825 830

Ser Ser Ala Ala His Ser Ile Gly Ser Thr Gln Ser Thr Pro Cys Ser
835 840 845

Ser Ser Ser Thr Ala
850

<210> 8

<211> 850

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Leu Ala Thr Ala Gly Pro Glu Pro Gly Ala Leu Cys Glu Leu Ser Pro
20 25 30

Val Ser Ala Ser His Pro Val Gln Ala Leu Met Glu Ser Phe Thr Val
35 40 45

Leu Ser Gly Cys Ala Ser Arg Gly Thr Thr Gly Leu Pro Gln Glu Val
50 55 60

His Val Leu Asn Leu Arg Thr Ala Gly Gln Gly Pro Gly Gln Leu Gln
65 70 75 80

Arg Glu Val Thr Leu His Leu Asn Pro Ile Ser Ser Val His Ile His
85 90 95

His Lys Ser Val Val Phe Leu Leu Asn Ser Pro His Pro Leu Val Trp
100 105 110

10

ES 2 648 492 T3

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

ES 2 648 492 T3

Ile Pro Pro Glu Leu Arg Ile Leu Leu Asp Pro Gly Ala Leu Pro Ala
370 375 380

Leu Gln Asn Pro Pro Ile Arg Gly Gly Glu Gly Gln Asn Gly Gly Leu
385 390 395 400

Pro Phe Pro Phe Pro Asp Ile Ser Arg Arg Val Trp Asn Glu Glu Gly
405 410 415

Glu Asp Gly Leu Pro Arg Pro Lys Asp Pro Val Ile Pro Ser Ile Gln
420 425 430

Leu Phe Pro Gly Leu Arg Glu Pro Glu Glu Val Gln Gly Ser Val Asp
435 440 445

Ile Ala Leu Ser Val Lys Cys Asp Asn Glu Lys Met Ile Val Ala Val
450 455 460

Glu Lys Asp Ser Phe Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Gly Met Asp Val Thr
465 470 475 480

Leu Leu Asp Pro Thr Cys Lys Ala Lys Met Asn Gly Thr His Phe Val
485 490 495

Leu Glu Ser Pro Leu Asn Gly Cys Gly Thr Arg Pro Arg Trp Ser Ala
500 505 510

Leu Asp Gly Val Val Tyr Tyr Asn Ser Ile Val Ile Gln Val Pro Ala
515 520 525

Leu Gly Asp Ser Ser Gly Trp Pro Asp Gly Tyr Glu Asp Leu Glu Ser
530 535 540

Gly Asp Asn Gly Phe Pro Gly Asp Met Asp Glu Gly Asp Ala Ser Leu
545 550 555 560

Phe Thr Arg Pro Glu Ile Val Val Phe Asn Cys Ser Leu Gln Gln Val
565 570 575

Arg Asn Pro Ser Ser Phe Gln Glu Gln Pro His Gly Asn Ile Thr Phe
580 585 590

Asn Met Glu Leu Tyr Asn Thr Asp Leu Phe Leu Val Pro Ser Gln Gly
595 600 605

Val Phe Ser Val Pro Glu Asn Gly His Val Tyr Val Glu Val Ser Val
610 615 620

ES 2 648 492 T3

Thr Lys Ala Glu Gln Glu Leu Gly Phe Ala Ile Gln Thr Cys Phe Ile
 625 630 635 640
 Ser Pro Tyr Ser Asn Pro Asp Arg Met Ser His Tyr Thr Ile Ile Glu
 645 650 655
 Asn Ile Cys Pro Lys Asp Glu Ser Val Lys Phe Tyr Ser Pro Lys Arg
 660 665 670
 Val His Phe Pro Ile Pro Gln Ala Asp Met Asp Lys Lys Arg Phe Ser
 675 680 685
 Phe Val Phe Lys Pro Val Phe Asn Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Cys
 690 695 700
 Glu Leu Thr Leu Cys Thr Lys Met Glu Lys His Pro Gln Lys Leu Pro
 705 710 715 720
 Lys Cys Val Pro Pro Asp Glu Ala Cys Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile
 725 730 735
 Ile Trp Ala Met Met Gln Asn Lys Lys Thr Phe Thr Lys Pro Leu Ala
 740 745 750
 Val Ile His His Glu Ala Glu Ser Lys Glu Lys Gly Pro Ser Met Lys
 755 760 765
 Glu Pro Asn Pro Ile Ser Pro Pro Ile Phe His Gly Leu Asp Thr Leu
 770 775 780
 Thr Val Met Gly Ile Ala Phe Ala Ala Phe Val Ile Gly Ala Leu Leu
 785 790 795 800
 Thr Gly Ala Leu Trp Tyr Ile Tyr Ser His Thr Gly Glu Thr Ala Gly
 805 810 815
 Arg Gln Gln Val Pro Thr Ser Pro Pro Ala Ser Glu Asn Ser Ser Ala
 820 825 830
 Ala His Ser Ile Gly Ser Thr Gln Ser Thr Pro Cys Ser Ser Ser Ser
 835 840 845
 Thr Ala
 850

<210> 9
 <211> 18
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

ES 2 648 492 T3

<400> 9

Gly Leu Gly Pro Val Glu Ser Ser Pro Gly His Gly Leu Asp Thr Ala
1 5 10 15

Ala Ala

5 <210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido sintético

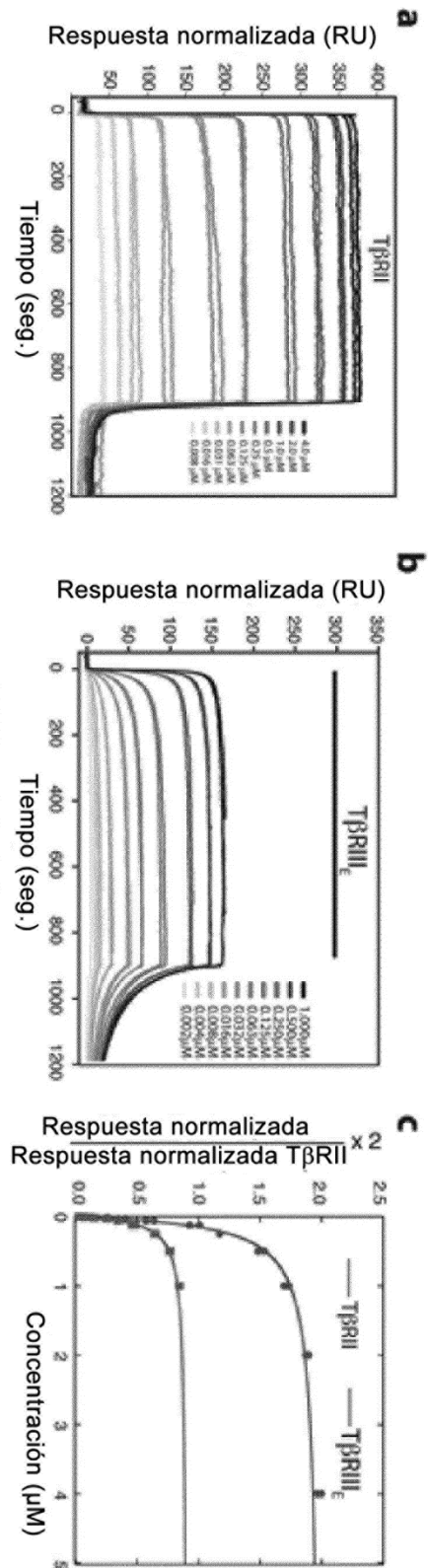
<400> 10

Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Ser Gly Ser Ala
1 5 10 15

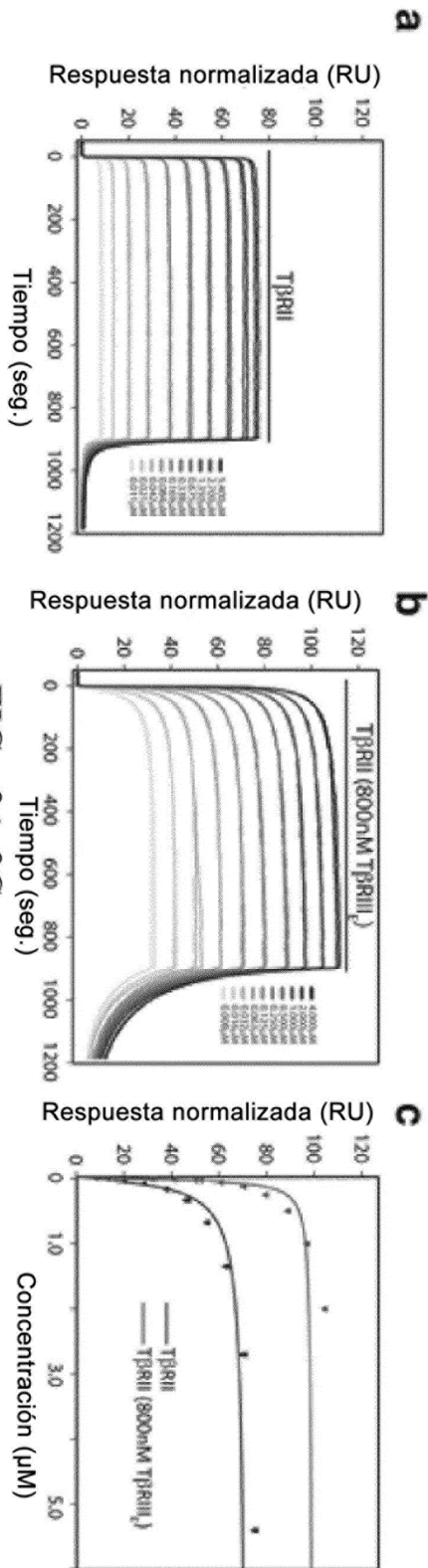
Phe Ser Ala Ala Ala
20

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión heterotrimérica que comprende:
 - 5 (a) un segmento amino terminal que comprende un primer dominio de unión a TGFβ de un receptor de TGFβ tipo II,
 - (b) un segmento central que comprende un dominio de endoglina del receptor de TGFβ tipo III, y
 - (c) un segmento carboxilo terminal que comprende un segundo dominio de unión a TGFβ del receptor de TGFβ tipo II.
- 10 2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, comprende además uno o más aminoácidos del conector entre el segmento amino terminal y el segmento central, y/o uno o más aminoácidos del conector entre el segmento central y el segmento carboxilo terminal.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde el segmento amino terminal comprende una
15 secuencia de aminoácidos que es el 90 % idéntica a la SEQ ID NO:3.
4. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde el segmento central comprende una secuencia de aminoácidos que es el 90 % idéntica a la SEQ ID NO:4 o a los aminoácidos 21-406 de la SEQ ID NO:8.
- 20 5. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde el segmento carboxilo terminal comprende una secuencia de aminoácidos que es el 90 % idéntica a la SEQ ID NO:5.
6. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos que es el 90 % idéntica a la SEQ ID NO:2.
- 25 7. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.
8. La proteína de fusión de la reivindicación 1 comprende además una secuencia señal en el extremo
30 amino terminal.
9. La proteína de fusión de la reivindicación 1, comprende además una etiqueta en el extremo amino terminal o carboxilo terminal.
- 35 10. La proteína de fusión de la reivindicación 9, donde la etiqueta es una hexa-histidina en el extremo carboxilo terminal.
11. Una proteína de fusión de la reivindicación 1 para su uso en un procedimiento de tratamiento de una
40 afección relacionada con el aumento de la expresión de TGFβ que comprende la administración de una cantidad eficaz de la proteína de fusión a un sujeto que la necesite.
12. La proteína de fusión para el uso de la reivindicación 11, donde la afección es un trastorno hiperproliferativo.
- 45 13. La proteína de fusión para el uso de la reivindicación 12, donde el trastorno hiperproliferativo es cáncer.
14. La proteína de fusión para el uso de la reivindicación 11, donde la afección es fibrosis.



FIGS. 1A-1C



FIGS. 2A-2C

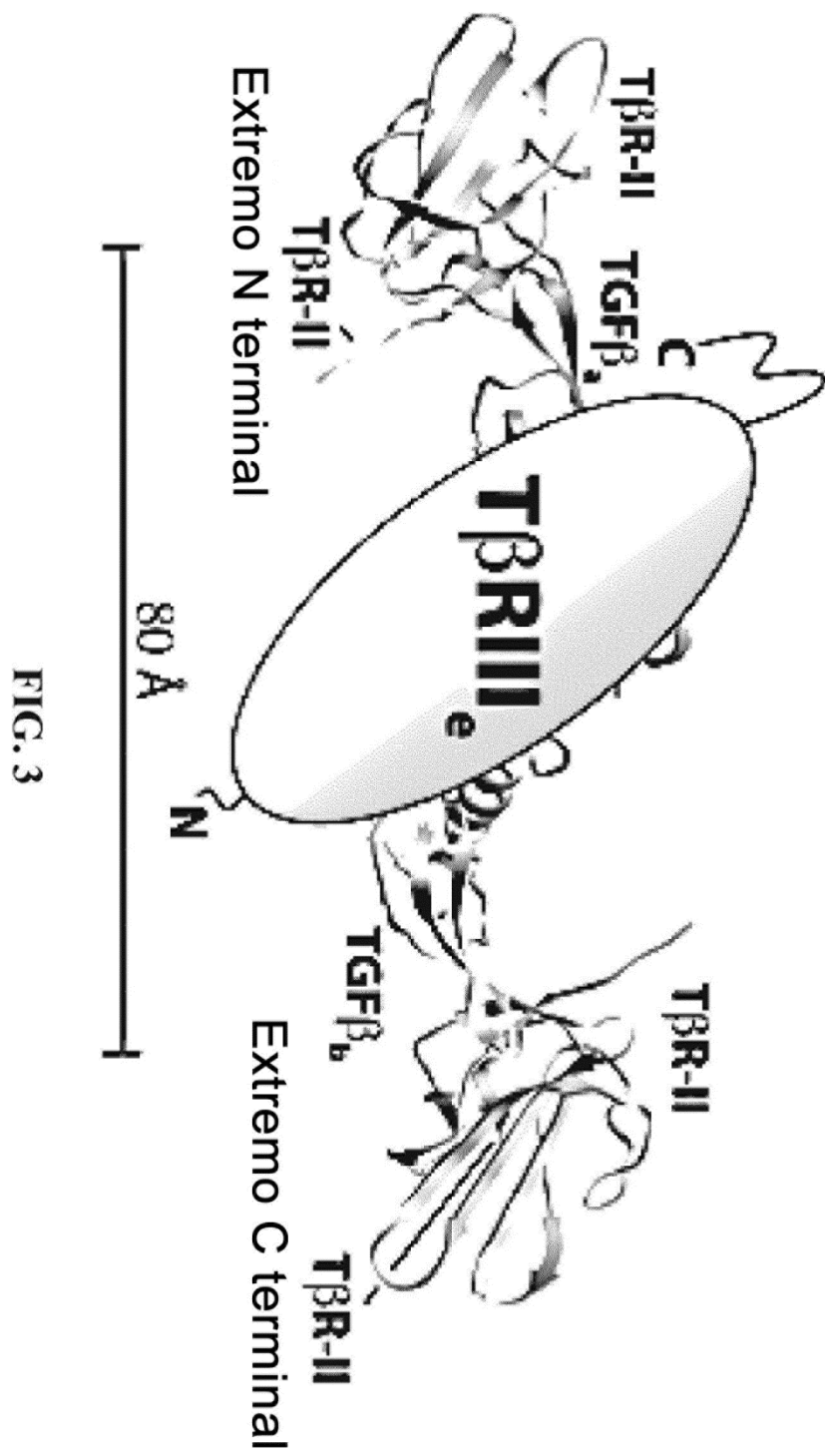


FIG. 3

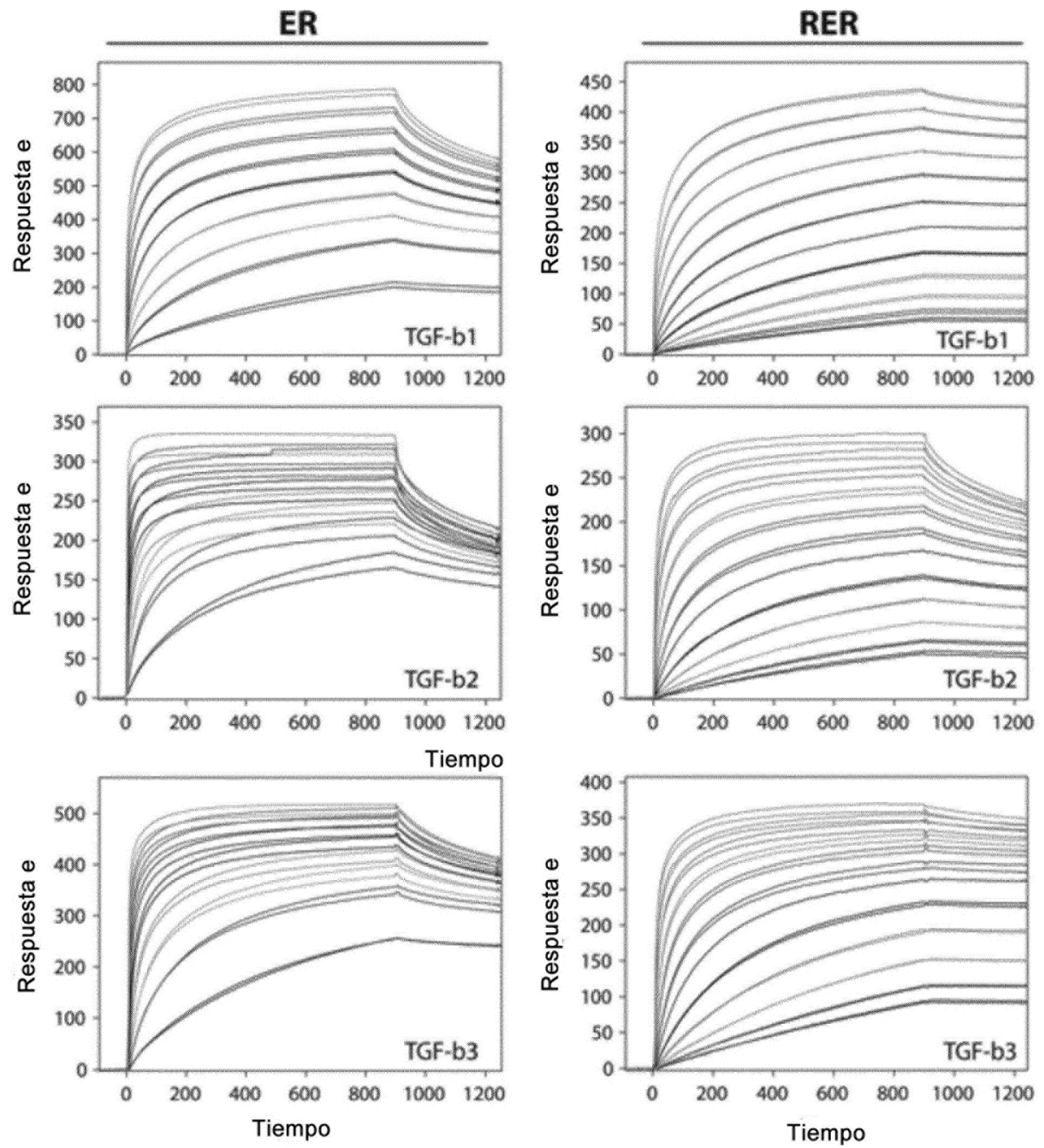
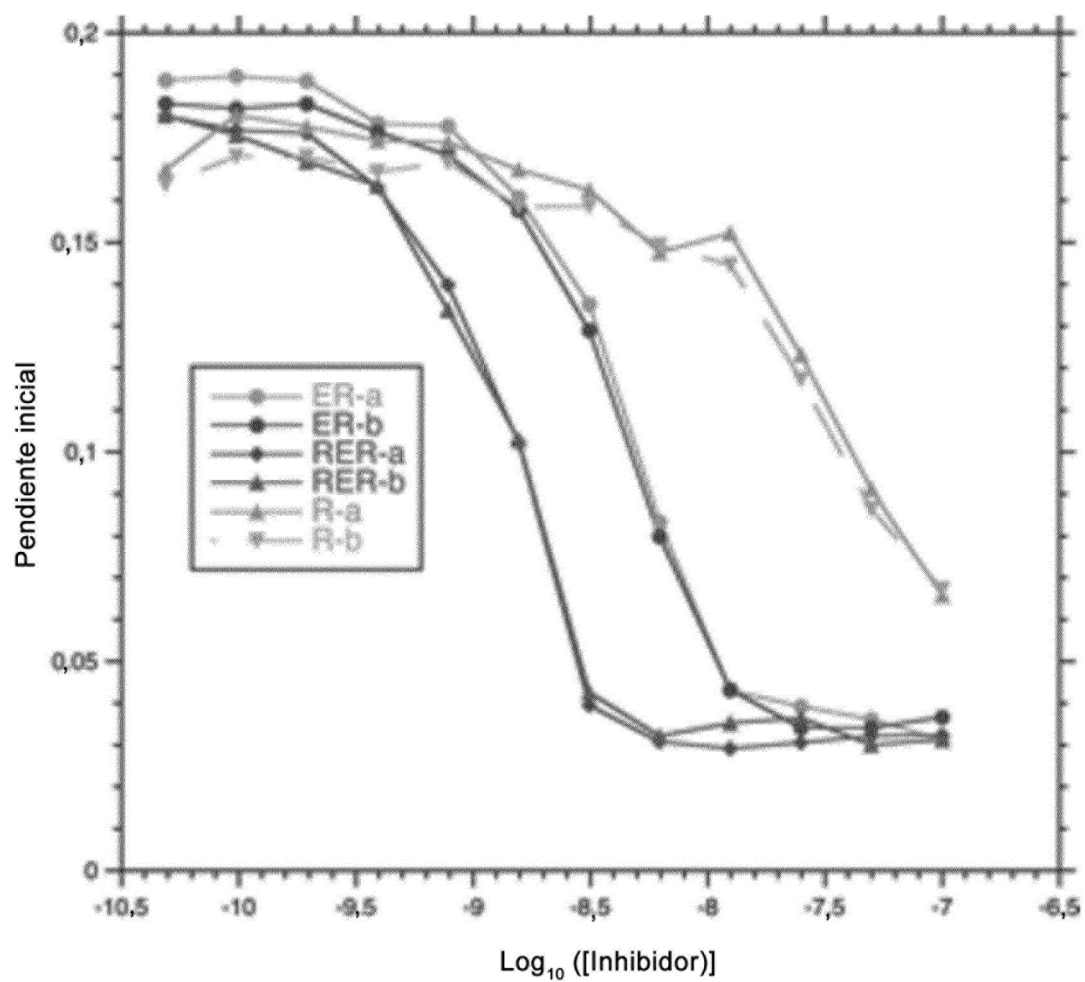
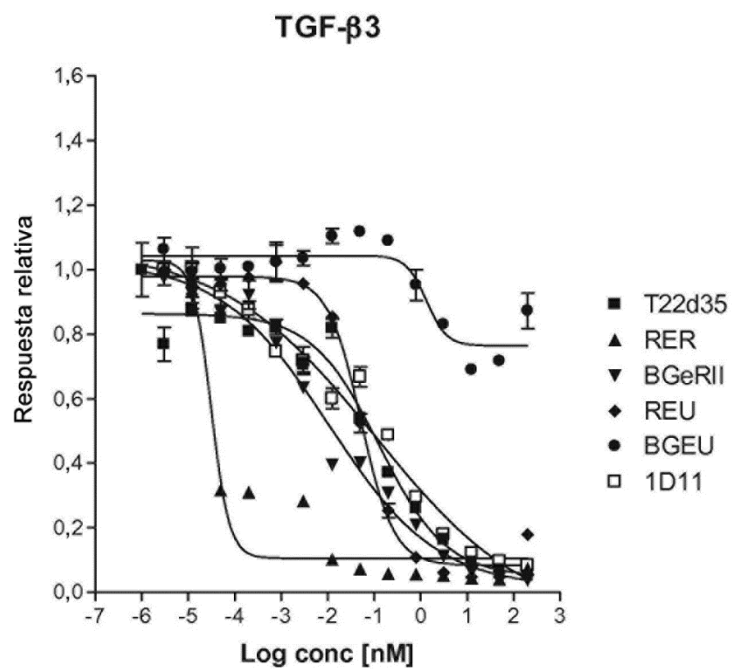
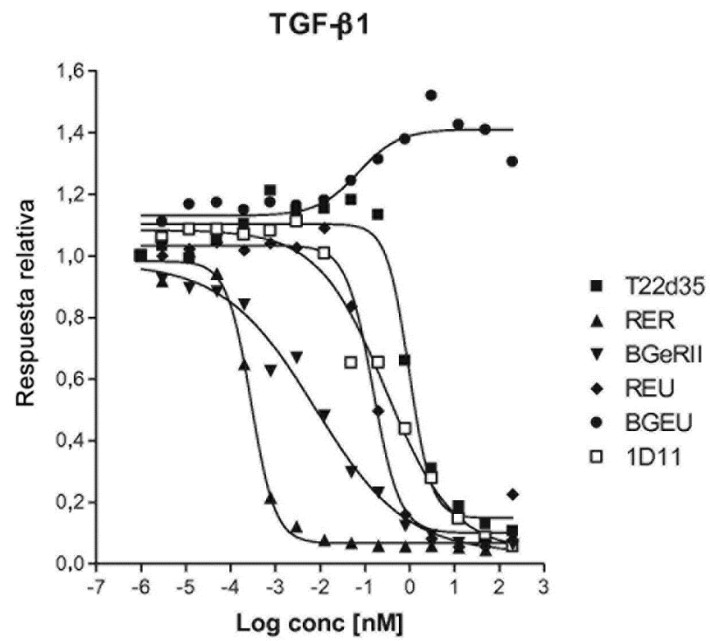


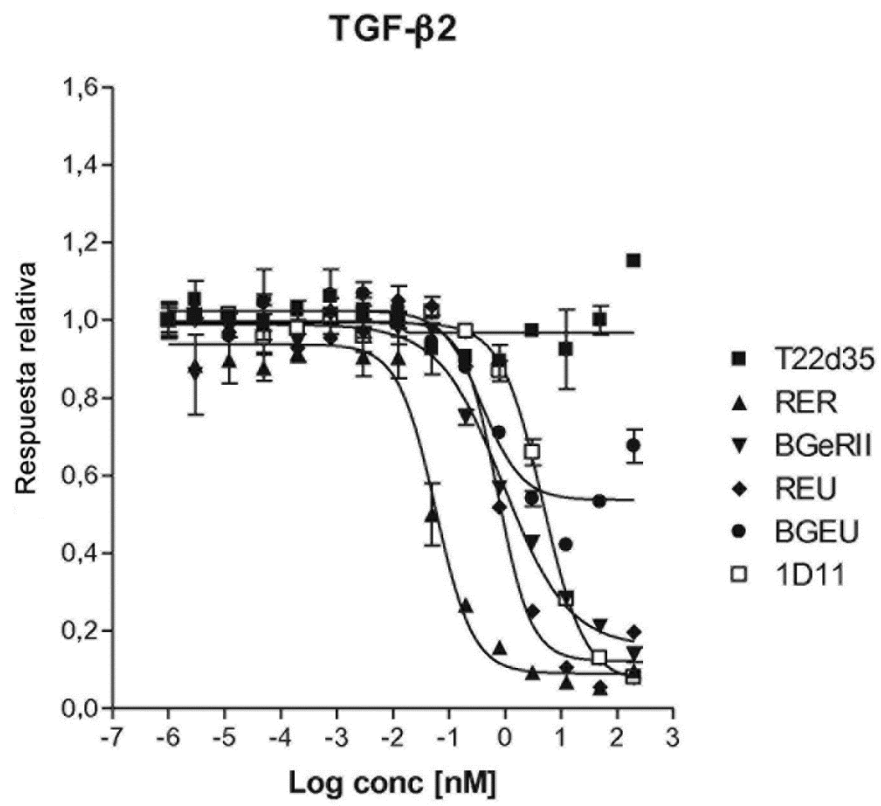
FIG. 4

**FIG. 5**

Potencia de neutralización de varios inhibidores TGF- β en un ensayo génico en células epiteliales de pulmón de visón (Mv1Lu) con luciferasa como indicador			
	CI ₅₀ (nM)	CI ₅₀ Std. Dev. (nM)	Número de mediciones
RR (RII-RII)			
TGF- β 1	1,5	0,8	4
TGF- β 2	n.d.	n.d.	4
TGF- β 3	0,27	0,22	4
RER (RII-BG_E-RII)			
TGF- β 1	0,00051	0,00022	3
TGF- β 2	0,070	0,018	3
TGF- β 3	0,0033	0,0058	3
ER (BG_E-RII)			
TGF- β 1	0,014	0,009	2
TGF- β 2	1,2	0,3	2
TGF- β 3	0,020	0,011	2
REU (RII-BG_E-BG_U, o RII-RIII)			
TGF- β 1	0,18	0,04	2
TGF- β 2	0,81	0,10	2
TGF- β 3	0,067	0,021	2
EU (BG_E-BG_U, o RIII)			
TGF- β 1	n.d.	n.d.	2
TGF- β 2	n.d.	n.d.	2
TGF- β 3	n.d.	n.d.	2
ID11 (Anticuerpo neutralizante anti TGF-β específico de la isoforma pan, de Genzyme)			
TGF- β 1	0,99	0,98	2
TGF- β 2	5,5	1,0	2
TGF- β 3	0,093	0,016	2

FIG. 6





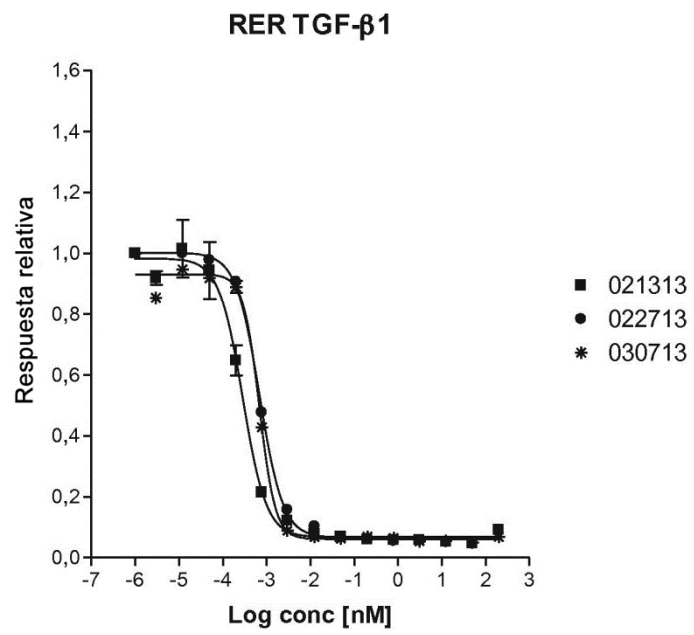


FIG. 8A

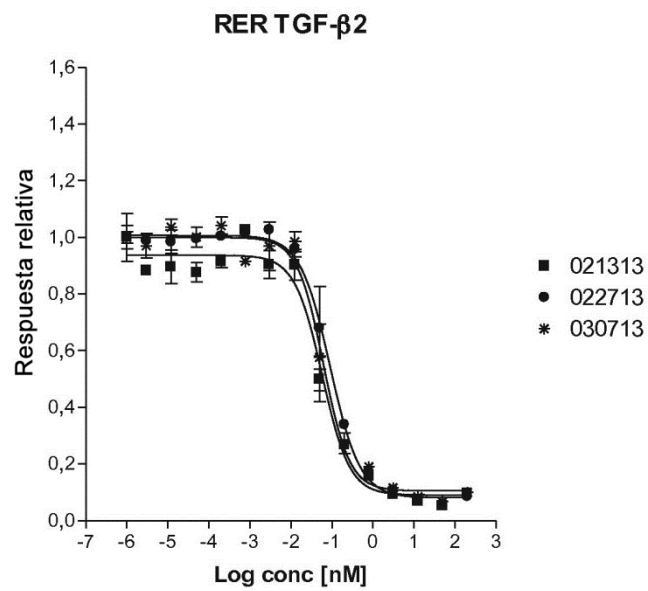


FIG. 8B

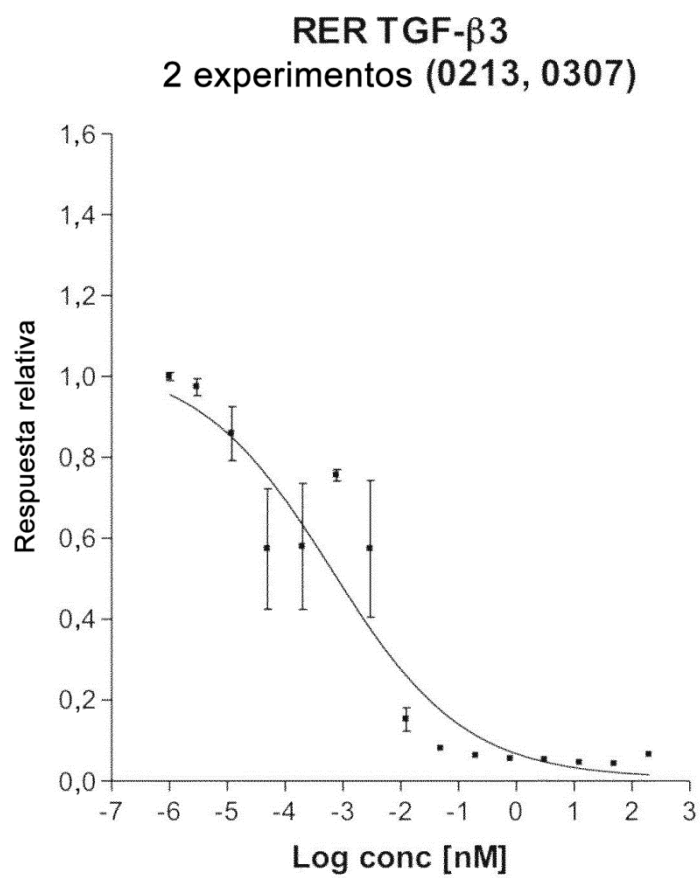


FIG. 8C