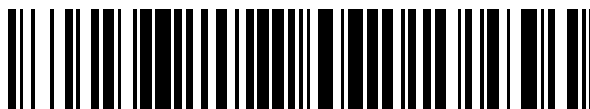


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 809**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2015** **PCT/CN2015/071434**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015** **WO15110067**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2015** **E 15739893 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 3098241**

54 Título: **Proteína de fusión que inhibe la angiogénesis o el crecimiento y uso de esta**

30 Prioridad:

25.01.2014 CN 201410035738

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.01.2018

73 Titular/es:

CHENGDU KANGHONG BIOTECHNOLOGIES CO., LTD. (100.0%)
No. 36 Shuxi Rd, Jinniu District
Chengdu, Sichuan 610036, CN

72 Inventor/es:

KE, XIAO y
GAO, XIAOPING

74 Agente/Representante:

VÁZQUEZ FERNÁNDEZ-VILLA, Concepción

ES 2 648 809 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

Proteína de fusión que inhibe la angiogénesis o el crecimiento y uso de esta

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la ingeniería genética. Particularmente, la presente solicitud se refiere a una proteína de fusión que inhibe la angiogénesis o el crecimiento vascular.

10 Antecedentes de la invención

En condiciones fisiológicas normales, la angiogénesis es un proceso muy regulado por varios factores y desempeña un papel vital en la reparación y el mantenimiento de la función normal del cuerpo. Sin embargo, el rápido crecimiento de los vasos sanguíneos dentro de un tumor es un fenómeno clínico común. En muchos modelos animales y estudios clínicos se ha demostrado que la inhibición de la angiogénesis en un tumor puede inhibir el crecimiento del tumor e inducir la muerte de células tumorales, de modo que se logra un efecto terapéutico. Por lo tanto, la inhibición de la angiogénesis se ha convertido en una tendencia importante para el desarrollo de fármacos antitumorales. Los fármacos antiangiogénicos macromoleculares, tales como la avastina, han sido aprobados por la FDA. También existen fármacos en estudios preclínicos y clínicos. Además, los nuevos fármacos antiangiogénicos también se usan ampliamente en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis tales como la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), la retinopatía diabética y dan como resultado un efecto terapéutico significativo.

La angiogénesis es un proceso complejo regulado por muchos factores biológicos activos. Un proceso clave en la angiogénesis es la unión y la activación de receptores de la superficie de las células endoteliales por diversos factores de crecimiento, que controlan la actividad de la célula endotelial a través de la señalización por fosforilación de la tirosina intracelular y mejoran la angiogénesis. Entre estos factores de crecimiento, el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF) es el factor más importante involucrado en el control de la angiogénesis. El VEGF es el factor más potente y más específico en la inducción y la mejora de la angiogénesis. Se sobreexpresa en casi todos los tumores humanos y, por lo tanto, se ha convertido en un objetivo molecular importante en el desarrollo de una terapia antitumoral. El VEGF tiene muchos receptores en la superficie de la célula endotelial vascular, que incluyen VEGFR-1 (denominado además Flt-1) y VEGFR-2 (denominado además KDR o Flk-1). Tanto el VEGFR-1 como el VEGFR-2 comprenden una porción extracelular, compuesta de 7 dominios de tipo inmunoglobulina (D1-D7) capaces de unirse al VEGF, y una porción intracelular que comprende un grupo de tirosina quinasa. Una vez que el receptor se activa mediante el VEGF, el gen de la tirosina quinasa intracelular se fosforila, lo que da como resultado una cascada de señalización y finalmente conduce a la angiogénesis. Debido a la importancia de la señalización del VEGF para la angiogénesis, el bloqueo del VEGF o del receptor del VEGF para inhibir la angiogénesis tiene un efecto anticanceroso significativo y también es importante para el tratamiento de otras enfermedades relacionadas con la angiogénesis tales como la vasculopatía retiniana.

La estabilidad de los agentes proteicos de fusión tiene una influencia importante en sus aplicaciones biotecnológicas, y además es vital para la mejora de la calidad de los fármacos y la realización de la producción industrial. La estructura espacial de una proteína cambia bajo determinadas condiciones físicas y químicas, lo que a su vez conduce al cambio en las propiedades físicas y químicas y la pérdida de la actividad biológica. Esto se denomina desnaturalización de proteínas, que se utiliza para describir el proceso por el cual una proteína cambia su estructura intramolecular y sus propiedades cuando se somete a la influencia de factores físicos o químicos. La detección de la estabilidad térmica de una proteína puede usarse para determinar la desnaturalización de manera eficaz y, por lo tanto, se usa como una prueba de estabilidad para las proteínas durante el desarrollo de proteínas terapéuticas. La detección de la estabilidad térmica se lleva a cabo principalmente mediante la irradiación de una muestra proteica con luz UV de manera que la muestra proteica emita fluorescencia, y la determinación de la temperatura de desnaturalización (T_m) de la muestra proteica midiendo la longitud de onda y la intensidad de la luz de la fluorescencia emitida, lo cual refleja el cambio en su estructura. Además, la agregación de proteínas se detecta por excitación de UV con el uso de la dispersión de luz estática. La intensidad de la luz de una muestra proteica cambia significativamente entre los estados de agregación y no agregación. La temperatura de inicio de la agregación (Tagg) de una muestra proteica puede detectarse con precisión de acuerdo con el cambio en la intensidad de la luz. La estabilidad de una proteína se refleja por la temperatura de desnaturalización (T_m) y la temperatura de inicio de la agregación (Tagg) de la proteína.

Las condiciones restrictivas para el desarrollo de fármacos macromoleculares incluyen el efecto terapéutico, la estabilidad y la viabilidad de la producción industrial del agente terapéutico. Es necesario encontrar un fármaco que inhiba la angiogénesis o el crecimiento vascular con un efecto terapéutico determinado y una gran estabilidad.

Descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una proteína de fusión para la inhibición de la angiogénesis o el crecimiento vascular con un efecto terapéutico determinado y alta estabilidad, en donde la proteína de fusión inhibe la angiogénesis o el crecimiento vascular mediante el bloqueo de la señalización del VEGF.

Para lograr el objeto anterior, se proporcionan las siguientes soluciones técnicas.

En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión para la inhibición de la angiogénesis y el crecimiento vascular, compuesta por un fragmento del receptor de VEGF humano y un fragmento Fc de inmunoglobulina humana unido a este, en donde la secuencia de aminoácidos del fragmento del receptor de VEGF es como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 1, la sec. con núm. de ident.: 3 o la sec. con núm. de ident.: 5.

En una modalidad, el fragmento Fc de inmunoglobulina humana de la proteína de fusión se selecciona del grupo que consiste en las siguientes secuencias: Fc de IgG1 (cuya secuencia de aminoácidos es la sec. con núm. de ident.: 7), Fc de IgG2 (cuya secuencia de aminoácidos es la sec. con núm. de ident.: 8), Fc de IgG3 (cuya secuencia de aminoácidos es la sec. con núm. de ident.: 9) y Fc de IgG4 (cuya secuencia de aminoácidos es la sec. con núm. de ident.: 10).

En una modalidad adicional, la proteína de fusión es, KH02, cuya secuencia de aminoácidos es como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 14; KH03, cuya secuencia de aminoácidos es como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 16; o KH04, cuya secuencia de aminoácidos es como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 18.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos es, kh02 que codifica la proteína de fusión KH02, cuya secuencia de nucleótidos es como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 13; kh03 que codifica la proteína de fusión KH03, cuya secuencia de nucleótidos es como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 15; o kh04 que codifica la proteína de fusión KH04, cuya secuencia de nucleótidos es como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 17.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión o una célula huésped que expresa la proteína de fusión, en donde el vector de expresión comprende la secuencia de nucleótidos anterior de la proteína de fusión. El vector de expresión puede ser un vector de expresión eucariótico recombinante, preferentemente un vector de expresión de células de mamíferos. El vector de expresión también puede ser un vector de expresión viral recombinante, el vector de expresión es preferentemente un virus adenoasociado o un vector de adenovirus. El vector de expresión es capaz de replicarse y expresarse en la célula huésped transformada. Preferentemente, la célula huésped es una célula CHO, o célula 293.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar la proteína de fusión, que comprende introducir el vector de expresión anterior en una célula huésped adecuada y expresar la proteína de fusión.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la presente invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, que se usa convencionalmente en la técnica. Preferentemente, la forma de dosificación de la formulación de la composición farmacéutica es una inyección, un polvo de inyección liofilizado o un gel oftálmico. La formulación puede prepararse mediante métodos conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de la proteína de fusión anterior en la preparación de un medicamento para tratar enfermedades provocadas por angiogénesis o crecimiento vascular, en donde las enfermedades provocadas por angiogénesis o crecimiento vascular son preferentemente un tumor o una enfermedad causada por angiogénesis en el ojo, donde la enfermedad causada por angiogénesis en el ojo es preferentemente degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, coriorretinopatía, etcétera.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar enfermedades provocadas por angiogénesis o crecimiento vascular que comprende administrar la proteína de fusión o composición farmacéutica de la presente invención a un paciente que lo necesite, en donde las enfermedades provocadas por angiogénesis o crecimiento vascular son preferentemente un tumor o una enfermedad causada por angiogénesis en el ojo, donde la enfermedad causada por angiogénesis en el ojo es preferentemente degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, coriorretinopatía, etcétera.

La proteína de fusión de la presente invención tiene una alta estabilidad térmica, y de ese modo la formación de agregados proteicos durante la fermentación se reduce significativamente y la pureza y el rendimiento de la proteína mejoran significativamente. Además, la presente proteína de fusión tiene buenas actividades biológicas.

Descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico que muestra la tendencia a la desnaturalización térmica de la proteína de fusión del receptor de VEGF. La curva en el gráfico refleja el aumento del pico de fluorescencia interna de la proteína junto con el aumento de la temperatura. La ordenada BCM (nm) muestra el pico de fluorescencia interna, mientras que la

La Figura 2 es un gráfico que muestra la tendencia a la agregación térmica de la proteína de fusión del receptor de VEGF. La curva en el gráfico refleja el cambio de intensidad de la dispersión de la luz estática de la proteína junto con el aumento de la temperatura. La ordenada SLS a 266 nm muestra la intensidad de la dispersión de la luz estática, mientras que la abscisa muestra la temperatura.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la inhibición de la proliferación inducida por VEGF de células HUVEC por la proteína de fusión del receptor de VEGF. La ordenada muestra la concentración de la proteína de fusión, mientras que la abscisa es la absorbancia que muestra la viabilidad celular evaluada mediante el método de CCK-8.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la inhibición de la migración de células HUVEC que induce el VEGF, por la proteína de fusión del receptor de VEGF. La abscisa muestra la relación molar de la proteína de fusión con respecto al VEGF, mientras que la ordenada es el % de migración global ($\% \text{ de migración global} = (F_{\text{proteína de fusión}} - F_{\text{basal}}) / (F_{\text{total}} - F_{\text{basal}})$), F_{basal} es la fluorescencia media del grupo de medio de cultivo, F_{total} es la fluorescencia media del grupo de VEGF, $F_{\text{proteína de fusión}}$ es la fluorescencia media del grupo de la proteína de fusión con diferentes relaciones molares).

Ejemplos

La presente invención se describirá adicionalmente a través de los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos solo se incluyen para ilustrar la presente invención y la presente invención no se limita a estos ejemplos. Cualquier modificación que un experto en la técnica pueda hacer a la luz de la presente descripción cae dentro del alcance cubierto por las reivindicaciones.

Descripción de las secuencias

Fragmento 1 del receptor de VEGF humano: la secuencia de aminoácidos es la sec. con núm. de ident.: 1, la secuencia de nucleótidos es la sec. con núm. de ident.: 2;
 Fragmento 2 del receptor de VEGF humano: la secuencia de aminoácidos es la sec. con núm. de ident.: 3, la secuencia de nucleótidos es la sec. con núm. de ident.: 4;
 Fragmento 3 del receptor de VEGF humano: la secuencia de aminoácidos es la sec. con núm. de ident.: 5, la secuencia de nucleótidos es la sec. con núm. de ident.: 6;
 Proteína de fusión KH01: la secuencia de aminoácidos es la sec. con núm. de ident.: 12, la secuencia de nucleótidos es la sec. con núm. de ident.: 11;
 Proteína de fusión KH02: la secuencia de aminoácidos es la sec. con núm. de ident.: 14, la secuencia de nucleótidos es la sec. con núm. de ident.: 13;
 Proteína de fusión KH03: la secuencia de aminoácidos es la sec. con núm. de ident.: 16, la secuencia de nucleótidos es la sec. con núm. de ident.: 15;
 Proteína de fusión KH04: la secuencia de aminoácidos es la sec. con núm. de ident.: 18, la secuencia de nucleótidos es la sec. con núm. de ident.: 17;
 Proteína de fusión KH05: la secuencia de aminoácidos es la sec. con núm. de ident.: 20, la secuencia de nucleótidos es la sec. con núm. de ident.: 19.

Ejemplo 1: Preparación de proteínas de fusión

Material o reactivos

Kit de PCR (que comprende tampón 5x, dNTP y enzima Phusion): M0530L, NEB Corp.
 Electroforesis en gel de agarosa: IQ300, GE Corp.
 Tampón 4 (número de lote: 0101201): NEB Corp.
 AvrII: R0174L, NEB Corp.
 BstZ17I: R0594L, NEB Corp.
 Kit de purificación de productos de PCR: QIAGEN Corp., CAT: 28106
 Tampón de T4 10x: B0202S, NEB Corp.
 T4 ADN ligasa: M0202L, NEB Corp.
 Top10 E. coli: CB104, TIANGEN Corp.
 Medio de cultivo en placa 2YT (KAN): Shanghai Rui Cong Laboratory Equipment Co., Ltd.
 Kit Freedom™ CHO-S™: A13696-01, LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION.
 Clone Pix FL: Genetix Corp.
 Columna de cromatografía de afinidad de agarosa con proteína A HiTrap: HiTrap protein A HP, 5 x 1 ml; GE Corp.
 Tampón PBS (fosfato 20 mM, pH 7,4): SD117-500 ml, Shanghai Biotech Co., Ltd.
 Detector de interacciones biomoleculares ForteBio: Octet QKe, Pall Corp.

Analizador de la estabilidad térmica de proteínas: Optim2, Avacta Corp.
VEGF: R&D Systems Inc.
NHS-LCLC-Biotina: Thermo Corp.

5 1. Construcción de plásmido que comprende secuencias que codifican una proteína de fusión.

1.1 Síntesis de genes y cebadores

10 Los fragmentos sintéticos 1 (sec. con núm. de ident.: 21) y 2 (sec. con núm. de ident.: 22) y los cebadores P1-P10 (las secuencias se muestran en las secs. con núms. de ident.: 23-32) se sintetizaron por Beijing GENEWIZ, Inc. Los fragmentos sintéticos 1 y 2 se recombinaron en el vector plasmídico pUC19 (Beijing GENEWIZ, Inc.). El fragmento sintético 1 comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento del receptor de VEGF humano y una secuencia del péptido señal, el fragmento sintético 2 comprende una secuencia codificante para el Fc de IgG1 humana. Las secuencias codificantes para las proteínas de fusión de la presente se construyeron mediante PCR con el uso de los cebadores más abajo y los fragmentos sintéticos 1 y 2 como molde para construir las proteínas de fusión respectivas.

1.2 Obtención de las secuencias codificantes para las proteínas de fusión.

20 La secuencia codificante para cada proteína de fusión se amplificó en dos partes, en donde la primera parte es un fragmento del receptor de VEGF humano; y la segunda parte es un fragmento Fc de IgG1 humana. El fragmento objetivo respectivo para cada parte se obtuvo mediante los cebadores específicos, y después el fragmento del receptor de VEGF humano y el fragmento Fc de IgG1 humana se unieron por PCR solapada, lo que produjo la secuencia génica completa final. El sistema de reacción para la PCR de amplificación de la primera y la segunda parte fue (volumen total 50 µl): 10 µl de tampón 5x, 2 µl de dNTP, 1 µl de cada uno de los cebadores directo e inverso específicos, 1 µl de molde (el fragmento sintético anterior 1 o 2) y 0,5 µl de enzima Phusion (enzima de fidelidad para la PCR), ajustados a 50 µl con agua doblemente destilada. La condición de reacción fue la siguiente: desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 s, seguido de 10 ciclos de 98 °C durante 10 s y 68 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 98 °C durante 10 s, 55 °C durante 30 s, y 72 °C durante 50 s, y finalmente 72 °C durante 5 min. Particularmente, para kh02, los cebadores para la primera parte fueron P1 y P6, el molde fue el fragmento sintético 1; los cebadores para la segunda parte fueron P5 y P2, el molde fue el fragmento sintético 2. Para kh03, los cebadores para la primera parte fueron P1 y P8, el molde fue el fragmento sintético 1; los cebadores para la segunda parte fueron P7 y P2, el molde fue el fragmento sintético 2. Para kh04, los cebadores para la primera parte fueron P1 y P10, el molde fue el fragmento sintético 1; los cebadores para la segunda parte fueron P9 y P2, el molde fue el fragmento sintético 2. Para la secuencia codificante de la proteína KH01 (kh01), los cebadores para la primera parte fueron P1 y P4, el molde fue el fragmento sintético 1; los cebadores para la segunda parte fueron P3 y P2, el molde fue el fragmento sintético 2. Los productos génicos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se obtuvo un total de 8 fragmentos, es decir, kh01-Q, kh01-H, kh02-Q, kh02-H, kh03-Q, kh03-H, kh04-Q y kh04-H. El sistema de reacción para la PCR solapada fue (volumen total 50 µl): 10 µl de tampón 5x, 2 µl de dNTP, 1 µl del primer y el segundo fragmento amplificado anterior como molde respectivamente (por ejemplo, para la amplificación de la longitud completa de kh01, se usó 1 µl del producto de recuperación de PCR kh01-Q y 1 µl del producto de recuperación de PCR kh01-H), 1 µl de los cebadores directo e inverso (P1, P2) respectivamente, y 0,5 µl de la enzima Phusion (enzima de fidelidad para la PCR), ajustados a 50 µl con agua doblemente destilada. La condición de reacción fue la siguiente: desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 s, seguida de 30 ciclos de 98 °C durante 10 s, 55 °C durante 30 s, y 72 °C durante 50 s, y finalmente 72 °C durante 5 min. Los productos génicos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (IQ300, GE). Se obtuvo un total de 4 fragmentos génicos, denominados kh01-1 (correspondiente a la sec. con núm. de ident.: 11, pero con una secuencia codificante de un péptido señal adicional), kh02-1 (correspondiente a la sec. con núm. de ident.: 13, pero con una secuencia codificante de un péptido señal adicional), kh03-1 (correspondiente a la sec. con núm. de ident.: 15, pero con una secuencia codificante de un péptido señal adicional), y kh04-1 (correspondiente a la sec. con núm. de ident.: 17, pero con una secuencia codificante de un péptido señal adicional). Se encontró que los fragmentos amplificados tenían el tamaño esperado por electroforesis.

1.3 Digestión enzimática de vectores y fragmentos génicos

55 El plásmido pCHO1.0 (de Life Technologies, número de catálogo: A13696-01), kh01-1, kh02-1, kh03-1 y kh04-1 se sometieron a doble digestión enzimática respectivamente. El sistema para la digestión enzimática fue el siguiente. 40 µl de plásmido pCHO1.0 o fragmento amplificado kh01-1, kh02-1, kh03-1 o kh04-1, 10 µl de tampón 10x 4 (NEB), 5 µl de AvrII (R0174L, NEB) y BstZ17I (R0594L, NEB) cada uno, y se añadieron 45 µl de agua estéril a un tubo EP de 1,5 ml, y la mezcla se incubó a 37 °C durante 5 h después de mezclar uniformemente. El producto se recuperó mediante un kit de purificación de productos de PCR (CAT: 28106, QIAGEN).

1.4 Ligación y transformación del plásmido recombinante

65 El fragmento pCHO1.0 recuperado (fragmento más grande obtenido por digestión con AvrII y BstZ17I, aproximadamente 13 kb) y el fragmento kh01-1, kh02-1, kh03-1 o kh04-1 recuperados (digerido con AvrII y BstZ17I),

obtenidos de la digestión por las mismas enzimas, se ligaron juntos en presencia de T4 ADN ligasa. El sistema de reacción para esta reacción fue el siguiente. 2 µl del fragmento pCHO1.0 (digerido con AvrII y BstZ17I), 6 µl del fragmento kh01-1, kh02-1, kh03-1 o kh04-1 (digeridos con AvrII y BstZ17I), 1 µl de tampón T4 10x (B0202S, NEB), y 1 µl de T4 ADN ligasa (M0202L, NEB) se añadieron a un tubo EP de 1,5 ml, la mezcla se mezcló uniformemente, y después se incubó a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C) durante 4 h. El producto de ligación se transformó en una célula de E. coli Top 10 competente (CB104, TIANGEN) y se sembró en una placa 2YT (KAN) (Shanghai Ruicong Laboratory Equipment Co., Ltd) para su incubación durante la noche a 37 °C. Las placas se identificaron como kh01, kh02, kh03 y kh04.

1.5 Detección de los plásmidos recombinantes por PCR de colonias.

Las colonias recombinantes individuales se seleccionaron de las placas kh01, kh02, kh03 y kh04 y se incubaron a 37 °C durante 3-5 h. Después de la incubación, estas colonias se usaron como moldes de PCR para la detección por PCR. El sistema de reacción (volumen total 20 µl) para esta amplificación por PCR fue el siguiente. 10 µl de Taq HS 2x (R013A, TAKATA), 2 µl de líquido bacteriano como molde, y 1 µl del cebador directo y el cebador inverso (P1 y P2, cada uno tiene una concentración final de 0,3 µmol/l), ajustado a 20 µl con agua doblemente destilada. La condición para la reacción fue: 94 °C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 60 s, 53 °C durante 60 s, y 72 °C durante 120 s, y finalmente 72 °C durante 5 min. Los resultados mostraron que se amplificó una banda objetivo de aproximadamente 1,6 Kbp de todas las colonias, lo que sugiere que estas colonias son todos clones positivos.

1.6 Identificación del plásmido recombinante por digestión enzimática.

Las colonias identificadas como positivas por la PCR de colonias se inocularon, seguid de la extracción del plásmido y la identificación por digestión enzimática. En primer lugar, los plásmidos se extrajeron de las bacterias recombinantes y después se analizaron por digestión enzimática. El sistema para la digestión enzimática fue el siguiente. Se añadieron 2 µl de plásmido, 1 µl de 10x tampón 4, 1 µl de AvrII y 1 µl de BstZ17I a un tubo EP de 1,5 ml, y se añadió agua estéril para ajustar el volumen total a 10 µl, y después la mezcla se mezcló uniformemente y luego se hizo reaccionar a 37 °C durante 4 h. La electroforesis en gel de agarosa confirmó la obtención de una banda de alrededor de 1,6 kb después de la digestión enzimática para todas las colonias, lo que sugiere que los clones seleccionados son todos clones positivos.

1.7 Identificación del plásmido recombinante mediante secuenciación

Las colonias identificadas como positivas por la PCR de colonias y la digestión enzimática se secuenciaron (Suzhou GENEWIZ biotech Co. Ltd.). Los resultados de la secuenciación fueron los esperados. Estos plásmidos de expresión se almacenaron para su uso posterior. Los clones con resultados positivos de secuenciación se numeraron como los siguientes, kh01-1 como 610, kh02-1 como 711, kh03-1 como 812, kh04-1 como 915.

2. Transfección de plásmidos y selección de células

La transfección se realizó con el uso de células huésped CHO-S en el kit Freedom™ CHO-S™ (A13696-01, LIFE TECHNOLOGIES) según lo sugerido por el fabricante. Se transfectaron cuatro plásmidos en este experimento: 610, 915, 812 y 711. Las células transfectadas con plásmidos se incubaron mediante cultivo en matraz agitado. El cultivo se realizó en CD FortiCHO (de Life Technologies) como el medio de cultivo a 37 °C, CO₂ al 8 % y 110 rpm/min durante 48 h. La viabilidad y el conteo de las células se detectaron mediante un contador de células.

48 horas después de la transfección, se realizó el esquema de selección en dos fases: 10P/100M, 20P/200M (P = puromicina a 10 µg/ml, M = nM metotrexato (MTX)); 30P/500M, 50P/1000M, con el uso de CD-FortiCHO como el medio de cultivo. Las células obtenidas después de la primera selección fueron 610, 915, 812 y 711 (es decir, que comprenden el plásmido respectivo anterior). La detección de clones individuales se realizó a una densidad de siembra de 500 células viables/ml, y 48 horas después de la transfección, cada grupo de células se sembró en 8 placas de seis pocillos y se incubaron durante 1 semana en una incubadora. El crecimiento del clon celular en cada placa se observó con un microscopio de fluorescencia. Se seleccionó un solo clon mediante Clone Pix FL (Genetix). Se detectó la expresión y pureza de las proteínas para seleccionar el clon para un cultivo a escala.

3. Expresión, purificación e identificación de proteínas

Las células del clon con alto rendimiento se seleccionaron para el cultivo a escala a partir de placas de 96 pocillos a placas de 24 pocillos, después a placas de 6 pocillos y después a matraces con agitación de 50 ml.

El sobrenadante del cultivo celular incubado durante 4-6 días se recogió y se centrifugó para eliminar los restos celulares. El sobrenadante recogido se filtró por un filtro de 0,45 µm. El pH se ajustó a 7,4. Las proteínas de fusión se purificaron mediante la columna de cromatografía de afinidad con la proteína A HiTrap (HiTrap protein A HP, 5 x 1 ml; GE). La columna se enjuagó con agua desionizada 5 x y se equilibró con tampón PBS 5 x (fosfato 20 mM, pH

7,4) (SD117-500 ml, Shanghai Biotech Co., Ltd). La columna se cargó con las muestras y se recogió el eluato para su detección. La columna se lavó con diez volúmenes de columna de tampón PBS (fosfato 0,02 mol/l, pH 7,4) para eliminar la proteína no objetivo, y la proteína objetivo se eluyó de la columna mediante tampón de glicina 0,1 M (pH 3). Las purzas de las proteínas se detectaron todas por encima del 90 % mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida).

Ejemplo 2. Análisis de pureza y rendimiento de la proteína

Las purzas de las proteínas en el caldo de fermentación se detectaron mediante SEC-HPLC. Además, la expresión de cada proteína obtenida en el Ejemplo 1 se detectó mediante el detector de interacciones biomoleculares ForteBio (Octet QKe, Pall). Los resultados se muestran en la Tabla 1. Puede observarse que los niveles de expresión y las purzas de las proteínas de fusión KH02-KH04 son mejores que las de la proteína KH01. Entre estas proteínas, la proteína de fusión KH02 es la mejor en términos de pureza y nivel de expresión. La pureza de esta proteína todavía se mantiene por encima del 80 % el día 9 de la incubación sin la adición de nutrientes.

Tabla 1: Comparación de la pureza del sobrenadante del cultivo celular de las proteínas

	Pureza (%)		Nivel de expresión (mg/l)	
	Día 7	Día 9	Día 7	Día 9
Sobrenadante del cultivo				
KH01	53.5	40.1	173.54	305.27
KH02	84.3	83.5	381.85	578.15
KH03	55.5	42.8	201.3	300.85
KH04	61.5	47.7	136.55	342.10

Ejemplo 3. Detección de la estabilidad térmica de la proteína de fusión del receptor de VEGF

(1) Detección de la tendencia a la desnaturalización térmica de la proteína de fusión del receptor de VEGF

La conformación espacial de una proteína se desnaturalizará cuando la proteína se someta a un tratamiento térmico. Los residuos de aminoácidos hidrófobos (tales como triptófano, tirosina y fenilalanina) que contienen grupos aromáticos estarán expuestos. El grado de desnaturalización de la proteína puede reflejarse mediante la intensidad de fluorescencia (IF) dentro de los grupos aromáticos. Durante la desnaturalización de la proteína, el espectro de fluorescencia de los fluoróforos internos cambiará. La proteína con estructura natural (normalmente plegada) tiene una intensidad de fluorescencia interna menor y el pico está alrededor de 330 nm. Por el contrario, la proteína desnaturalizada tiene una intensidad de fluorescencia interna significativamente incrementada y el pico se desplazará a alrededor de 350 nm. La temperatura media de desnaturalización térmica T_m puede calcularse analizando el cambio de la intensidad de fluorescencia interna y el desplazamiento del pico de la proteína, y refleja indirectamente la tendencia a la desnaturalización térmica.

La tendencia a la desnaturalización térmica de la proteína de fusión del receptor de VEGF se detectó mediante el analizador de la estabilidad térmica de proteínas (Optim2, Avacta). Aproximadamente 15 μ l de cada muestra a detectar (PBS 1 mg/ml, pH 7,2, pureza superior al 90 %) se añadieron al tubo de reacción de Optim2. El rango para el barrido de temperatura se ajustó a 25 °C - 95 °C. Las muestras se incubaron en cada punto de temperatura durante 60 s. Los datos se procesaron por el programa informático de análisis Optim2. Los resultados se muestran en la Figura 1 y la Tabla 2. Se muestra que entre las proteínas recombinantes expresadas en el Ejemplo 1, KH02 tiene la temperatura de desnaturalización más alta, lo que sugiere la menor tendencia a la desnaturalización térmica. Es decir, KH02 tiene la mayor estabilidad térmica.

Tabla 2: Parámetros para la desnaturalización térmica de la proteína de fusión del receptor de VEGF

Muestras	Temperatura de desnaturalización1	Temperatura de desnaturalización2	Temperatura de desnaturalización3
KH01	43,9 °C	61,2 °C	71,2 °C
KH02	48,0 °C	63,7 °C	77,6 °C
KH03	/	63,4 °C	76,7 °C
KH04	/	63,3 °C	77,1 °C

(2) Análisis de la tendencia a la agregación térmica de la proteína de fusión del receptor de VEGF

La dispersión de la luz ocurrirá cuando la proteína se expone a luz ultravioleta. En un rango determinado, la intensidad de la dispersión de la luz estática se relaciona linealmente con el tamaño de la proteína (10 - 600 KD). La detección de la intensidad de la dispersión de la luz SCS (Dispersión de la luz estática) puede mostrar el cambio en el tamaño de la proteína. La tendencia a la agregación de proteínas puede reflejarse indirectamente al calcular la temperatura de inicio de la agregación (Tagg) de la proteína.

La tendencia a la agregación térmica de la proteína de fusión del receptor de VEGF se detectó mediante el analizador para la estabilidad térmica de proteínas (Optim2, Avacta). Aproximadamente 15 µl de cada muestra a detectar (PBS 1 mg/ml, pH 7,2, pureza superior al 90 %) se añadieron al tubo de reacción de Optim2. El rango para el barrido de temperatura se ajustó a 25 °C - 95 °C. Las muestras se incubaron en cada punto de temperatura durante 60 s. Los datos se procesaron por el programa informático de análisis Optim2. Los resultados se muestran en la Figura 2 y la Tabla 3. Se muestra que la intensidad de la dispersión de la luz estática aumenta junto con el aumento de la temperatura, y entre las proteínas recombinantes, KH02 tiene la mayor temperatura de inicio de la agregación (Tagg), lo que sugiere la menor posibilidad de agregación térmica.

Tabla 3: Tendencia a la agregación térmica de la proteína de fusión del receptor de VEGF

Muestra	Tagg
KH01	65,6 °C
KH02	71,8 °C
KH03	69,8 °C
KH04	68,8 °C

Ejemplo 4. Detección de actividades biológicas de la proteína de fusión del receptor de VEGF

(1) Proliferación de células HUVEC

Las células endoteliales venosas umbilicales humanas (HUVEC, ScienCell) que crecieron bien se sembraron en placas de 96 pocillos a 3×10^5 células/pocillo y 100 µl/pocillo a 37 °C, CO₂ al 5% durante 20 horas. Se usó medio ECM (medio de células endoteliales, núm. de catálogo 1001, Sciencell) que contenía suero bovino fetal al 2 % para preparar la proteína de fusión del receptor de VEGF con diferentes concentraciones molares (0,0023, 0,007, 0,023, 0,065, 0,19, 0,57, 1,7, 5, 15, 45, 135 nM), que después se mezcló uniformemente con VEGF a 40 ng/ml (R&D SYSTEMS), y se incubó durante 2 h. Después, se añadieron 100 µl de la mezcla a las células HUVEC en la placa de 96 pocillos por célula en triplicado. La placa se incubó continuamente con CO₂ al 5 % durante 96 horas. Al final de la incubación, se añadió CCK8 (Dojindo). El efecto inhibidor de la proteína de fusión del receptor de VEGF se mostró en la EC₅₀. Los resultados se muestran en la Figura 3 y la Tabla 4. Todas las presentes proteínas de fusión del receptor de VEGF pudieron inhibir eficazmente la proliferación de células HUVEC estimulada por el VEGF, lo que sugiere que las presentes proteínas de fusión del receptor de VEGF tienen buena actividad biológica en términos de la inhibición del VEGF.

Tabla 4: Las proteínas de fusión del receptor de VEGF inhiben la proliferación de células HUVEC estimulada por el VEGF

Muestra	EC ₅₀ (nM)
KH01	1.93
KH02	1.26
KH03	2.11
KH04	1.43

(2) Migración de células HUVEC

El efecto de la presente proteína de fusión sobre la migración de células HUVEC se analizó con el uso de una cámara de Boyden modificada (sistema de angiogénesis FluoroBlok™ Biocoat: migración de células endoteliales, BD). Las células HUVEC que crecieron bien se sembraron en el compartimiento superior de la cámara de Boyden a 3×10^5 células/ml y 75 µl/pocillo. Se usó medio básico ECM (núm. de catálogo 1001, Sciencell) que contenía suero bovino fetal al 2 % para preparar la proteína de fusión del receptor de VEGF con diferentes concentraciones molares (13333 nM, 4444 nM, 1481 nM, 494 nM, 164,5 nM, 54,8 nM, 18,3 nM, 6,1 nM), que después se mezclaron

uniformemente con VEGF 500 pM (R&D SYSTEMS), se incubaron durante 2 h, y después se añadieron al compartimiento inferior de la cámara de Boyden a 225 µl/pocillo. Toda la cámara se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 20-24 h. El medio de cultivo en el compartimiento inferior se eliminó. Se añadió colorante fluorescente Calceína AM (Anaspec) con una concentración final de 5 µg/ml formulada con el uso de tampón HBSS (solución salina equilibrada de Hanks). La cámara se incubó a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 90 minutos en la oscuridad, y después se detectó el valor de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 494 nm y una longitud de onda de detección de 517 nm en un lector multimodo. Se calculó la migración relativa de las células. Como se muestra en la Figura 4, las proteínas de fusión del receptor de VEGF de la presente invención son sustancialmente iguales en cuanto a la inhibición de la migración inducida por VEGF en las células HUVEC. Esto confirma nuevamente que la proteína de fusión KH02 de la presente invención tiene una mejor actividad biológica en términos de inhibición del VEGF.

Ejemplo 5. Prueba de afinidad de unión entre la proteína de fusión del receptor de VEGF y el VEGF

La afinidad de unión entre la proteína de fusión del receptor de VEGF humano y el VEGF humano se detectó en el detector de interacciones biomoleculares ForteBio (Octet QKe, Pall) mediante Biolyayer-Interferometry (BLI). El VEGF humano (núm. de catálogo 293-VE-010, R&D SYSTEMS) y NHS-LCLC-biotina (núm. de catálogo 21338, Thermo) se mezclaron uniformemente a una relación molar de 1:3, y se colocaron a temperatura ambiente durante 1 h, después el resto de NHS-LCLC-biotina se eliminó, lo que produjo el producto marcado final de biotina-hVEGF a 50 µg/ml. Se cargó la biotina-hVEGF a 50 µg/ml en un sensor de estreptavidina. Las muestras a analizar se formularon a diferentes concentraciones (600 nM, 200 nM, 66,7 nM, 22,2 nM, 7,4 nM, 2,46 nM, 0,82 nM, respectivamente) mediante tampón de dilución de muestras (PBS, BSA al 0,1 %, Tween-20 al 0,02 %, NaN₃ al 0,003 %). El tampón de dilución de muestras sirvió como control de blanco. Los parámetros para la cinética de unión entre el hVEGF y la proteína de fusión del receptor se detectaron en el modo de análisis cinético. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Se muestra que todas las proteínas de fusión del receptor de VEGF expresadas en el Ejemplo 1 se unen significativamente con el VEGF humano. Entre estas proteínas, el valor de KD de KH02 es de aproximadamente 0,33 nM. Especialmente, la velocidad de disociación dinámica del complejo de KH02 con el VEGF es menor que las otras proteínas de fusión, lo que sugiere la mayor afinidad de unión.

Tabla 5: Parámetros para la afinidad de unión entre la proteína de fusión del receptor de VEGF y el VEGF humano

	KD (nM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
KH01	0,51 ± 0,04	6,91 ± 0,09 × 10 ⁴	3,53 ± 0,06 × 10 ⁻⁵
KH02	0,33 ± 0,02	5,16 ± 0,05 × 10 ⁴	1,70 ± 0,05 × 10 ⁻⁵
KH03	1,17 ± 0,05	8,67 ± 0,02 × 10 ⁴	1,01 ± 0,04 × 10 ⁻⁴
KH04	0,35 ± 0,02	2,06 ± 0,05 × 10 ⁵	7,27 ± 0,02 × 10 ⁻⁵
Notas: Kon: constante de asociación, Kdis: constante de disociación			

Ejemplo 6. Experimento de afinidad de las proteínas de fusión

1.1 Reactivos

Tabla 6: Lista de los reactivos utilizados

Nombre	Fabricante	Núm. de catálogo	Lote núm.
rhVEGF165	R&D Systems Inc.	293-VE	II4113062
Anticuerpo Fc de IgG humana HRP	BETHYL Corp.	A80-104P	A80-104P-78
Solución de sustrato TMB	R&D Systems Inc.	DY999	308030
BSA	BOVOGEN Corp.	BSA S1.0	269
Tween 20	Riedel-deHaën Corp.	63158	41620
Tampón PBS 20x	Biotech Co.	SD8117	13042099Z

Tabla 7: Lista de instrumentos

Nombre	Marca	Dispositivo núm.
Lector de microplacas	Molecular Devices Corp.	JC084
Mezclador Mini vortex	Shanghai LUXI Corp.	GY227
Balanza electrónica	Sartorius Corp.	JC082

1.2 Protocolo

1) Preparación de reactivos

- i. Tampón PBS 10x: 80,1 g de NaCl, 2,0 g de KCl, 2,0 g de KH_2PO_4 y 29,0 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en agua pura y el volumen final se ajustó a 1000 ml;
- ii. Tampón PBS 1x: Se disolvieron 100 ml de tampón PBS 10x en 850 ml de agua pura, se ajustó el pH a pH 7,2 - 7,4, y el volumen final se completó a 1000 ml;
- iii. Tampón de carbonato: 1,59 g de Na_2CO_3 y 2,93 g de NaHCO_3 se disolvieron en 1000 ml de agua ultrapura, el pH fue de 9,6-9,8, y la solución se almacenó a temperatura ambiente, y se filtró con un filtro de 0,22 μm antes de su uso.
- iv. BSA (albúmina de suero bovino): almacenada a 4 °C;
- v. Tampón de enjuague: PBS 1x que contenía polisorbato 20 al 0,05 % (v/v);
- vi. Solución de bloqueo y diluyente: PBS 1x que contenía BSA al 1 % (p/v);
- vii. Solución de parada (H_2SO_4 2N): Se añadieron lentamente 27,8 ml de ácido sulfúrico concentrado a 472,2 ml de agua pura. El ácido sulfúrico concentrado es un líquido corrosivo fuerte y debe añadirse con agitación con una varilla de vidrio y manipularse con extremo cuidado;
- viii. Solución madre de rhVEGF₁₆₅ (R&D SYSTEMS, 293-VE, 50 μg /frasco): Se filtraron 3 ml de PBS 1x con un filtro de 0,22 μm . Se añadieron 800 μl de PBS filtrado a un frasco de rhVEGF₁₆₅ sin abrir previamente. Cuando el material sólido visible en el frasco se disolvió, se añadieron 200 μl de PBS filtrado adicional. El frasco se colocó a temperatura ambiente durante 10 minutos para disolver completamente el rhVEGF₁₆₅. La concentración de la solución madre del rhVEGF₁₆₅ disuelto era de 50 μg /ml. La solución madre se dividió en alícuotas de 25 μl /frasco. La solución madre puede almacenarse a -20 °C durante 6 meses.
- ix. Anticuerpo de Fc de IgG humana HRP Anticuerpo de detección (BETHYL A80-104P): 1 mg/ml, almacenado a 4 °C.

2) Recubrimiento de la placa

Se añadieron 20 μl de la solución madre de rhVEGF₁₆₅ a 7980 μl de tampón de carbonato, la mezcla se mezcló uniformemente y se denominó solución de recubrimiento A y su concentración fue de 125 ng/ml. Se añadieron 2500 μl de la solución de recubrimiento A a 2500 μl de tampón de carbonato, la mezcla se mezcló uniformemente y se denominó solución de recubrimiento B. Se recubrió una microplaca en las columnas 1-6 con la solución de recubrimiento A, y en las columnas 7-12 con la solución de recubrimiento B, en donde el volumen usado en el recubrimiento fue de 100 μl /pocillo. La placa se selló mediante gel de sellado y se incubó durante la noche a temperatura ambiente.

3) Enjuague de la placa

La placa se lavó con 250 μl de tampón de enjuague por pocillo y se mantuvo empapada durante 120 s, lo cual se repitió tres veces. Las gotas restantes se eliminaron con golpes suaves a la placa sobre una toalla de papel hasta que no quedó una marca obvia de agua sobre la toalla de papel.

4) Bloqueo de la placa

La solución de bloqueo se añadió a 300 μl /pocillo mediante una pipeta de 8 canales. Después, la placa se selló mediante gel de sellado y se incubó a 37 °C durante 2 horas.

5) Preparación de la muestra

Las muestras (proteínas de fusión KH02 y KH05) se diluyeron a 1600 ng/ml de acuerdo con la concentración proteica inicial. El volumen de la muestra de 1600 ng/ml debe ser al menos superior a 800 μl . Se realizó una dilución en serie 4 x mediante la adición de 600 μl de solución de dilución a 200 μl de muestra, y dicha operación de dilución se repitió en serie para obtener 8 gradientes de concentración diferentes (que incluyen 1600 ng/ml).

6) Adición de la muestra

La placa se enjuagó como se describió anteriormente. Se añadieron las muestras a 100 µl/pocillo a la microplaca de manera sucesiva y la placa se selló mediante gel de sellado. La carga se realizó desde la concentración alta hasta la concentración baja por duplicado. Después de la carga, la placa se incubó a 37 °C durante 1 h.

7) Adición del anticuerpo de prueba

La placa se enjuagó como se describió anteriormente. 0,5 µl del anticuerpo de Fc de IgG humana HRP se diluyó en 10 ml de solución de bloqueo y la mezcla se mezcló uniformemente. A los pocillos se añadieron 100 µl/pocillo del anticuerpo de prueba diluido, y la placa se incubó a 37 °C durante 1 h.

8) Revelado del color

La placa se enjuagó como se describió anteriormente. Se añadieron 100 µl/pocillo de la solución de sustrato TMB. La placa se incubó en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 5 minutos.

9) Detención y obtención de la lectura

Se añadieron 50 µl/pocillo de la solución de parada y la reacción se terminó. La microplaca se colocó bajo el lector de microplacas para obtener una lectura bajo 450 nm.

1.3 Resultados de la prueba de afinidad

Tabla 8: Resultados de la prueba de afinidad de las muestras

Muestra	Tratamiento	Kd (unidad: pM)
KH05	Día 0	27.253
	5 días a alta temperatura	65.471
	10 días a alta temperatura	174.983
KH02	Día 0	22.491
	5 días a alta temperatura	46.420
	10 días a alta temperatura	70.504

A partir de los resultados en la Tabla 8, puede observarse que la afinidad de KH02 después de un tratamiento a alta temperatura por 10 días todavía está dentro del rango aceptable (22 - 84 pM). Sin embargo, la afinidad de KH05 después de un tratamiento a alta temperatura por 10 días excede con mucho el rango aceptable. Por lo tanto, la estabilidad de KH02 en términos de actividad es mejor que KH05.

Ejemplo 7. Prueba de pureza a alta temperatura

1.1 Reactivos y dispositivos

Tabla 9: Lista de reactivos utilizados

Nombre	Núm. de Catálogo	Especificación	Fabricante
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	20130527	500 g/frasco	Guangdong Guanhua Corp.
NaCl	201100905	500 g/frasco	Guangdong Guanhua Corp.
Arg-HCl	20110318	N/A	Shanghai Yuanju Biotech Corp.
HCl Concentrado	20121101	N/A	Chengdu Kelong Corp.
Columna cromatográfica	S0534	TSK G3000 SWxl, 5 µm, 7,8x300 mm	TOSOH Corp.
Columna de protección TSK	R1479	40*60	TOSOH Corp.

Tabla 10: Lista de los principales dispositivos utilizados

Nombre	Dispositivo núm.	Fabricante	Patrón núm.
Espectrometría líquida de alto rendimiento	JC073	Agilent Technologies Inc.	1200
Mezclador Mini vortex	GY265	Shanghai LUXI Corp.	WH-3
Balanza electrónica	JC080	Sartorius Corp.	BS224S
pH metro	JC077	METTLER Corp.	TOLEDO S40K

1.2 Protocolo

1) Preparación de reactivos

- i. Fase móvil de PBS: 7,16 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 8,77 g de NaCl y 42,2 g de Arg se disolvieron en 800 ml de agua ultrapura, el pH se ajustó a pH 7,2 con HCl, el volumen final se ajustó a 1000 ml y la solución resultante se filtró por un filtro de Φ 0,22 μm .
- ii. Solución de protección para la columna cromatográfica (NaN_3 al 0,05 %): Se disolvieron 0,5 g de NaN_3 en 1000 ml de agua ultrapura y la solución resultante se filtró por un filtro de Φ 0,22 μm .
- iii. Agua ultrapura: se filtró por un filtro de Φ 0,22 μm .

2) Preparación de la muestra

Dado que la concentración de cada muestra (KH02, KH05) fue de 1 mg/ml, estas muestras pueden cargarse directamente.

3) Condiciones para el análisis cromatográfico

Fase móvil: Fase móvil de PBS;
 Columna cromatográfica: TSK G3000 SW_{XL} (5 μm , 7,8 * 300 mm);
 Temperatura de la columna: 25 °C; velocidad de flujo: 0,5 ml/min; longitud de onda de detección: 280 nm;
 volumen de carga: 50 μl .

1.3 Resultados

Tabla 11: Resultados de la prueba de pureza por SEC-HPLC de las muestras

Muestra	Tratamiento	Pureza detectada (%)
KH05	Día 0	99.19
	5 días a alta temperatura	54.06
	10 días a alta temperatura	25.20
KH02	Día 0	96.75
	5 días a alta temperatura	94.29
	10 días a alta temperatura	65.15

Como puede observarse en la Tabla 11, la pureza de KH05 disminuyó al 54 % después de un tratamiento de alta temperatura durante 5 días. La pureza de KH05 fue solo del 25 % después de un tratamiento de alta temperatura durante 10 días. La disminución de la pureza de KH02 no fue evidente después de un tratamiento de alta temperatura durante 5 días. La pureza de la muestra de KH02 fue de hasta 65 % después de un tratamiento de alta temperatura durante 10 días.

Lista de secuencias

<110> CHENGDU KANGHONG BIOTECHNOLOGIES CO., LTD.

<120> PROTEÍNA DE FUSIÓN QUE INHIBE LA ANGIOGÉNESIS O EL CRECIMIENTO Y USO DE ESTA

<130> DP1P150042ZX

<150> CN201410035738.1

<151> 2014-01-25

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 296

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

ES 2 648 809 T3

Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys
180 185 190

5

Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly
195 200 205

10

Ser Gly Met Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg
210 215 220

15

Ile Pro Ala Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr
225 230 235 240

Lys Asn Gly Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His
245 250 255

20

Val Leu Thr Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr
260 265 270

25

Val Ile Leu Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val
275 280 285

30

Ser Leu Arg Val Tyr Val Pro Pro
290 295

<210> 2
<211> 888
<212> ADN
35 <213> Homo sapiens
<400> 2

40 ggtagacctt tcgtagagat gtacagtga atccccgaaa ttatacacat gactgaagga 60
agggagctcg tcattccctg ccgggttacg tcacctaaca tcaactgttac tttaaaaaag 120
tttcacttg acactttgat ccctgatgga aaacgcataa tctgggacag tagaaagggc 180
ttcatcatat caaatgcaac gtacaaagaa atagggcttc tgacctgtga agcaacagtc 240
45 aatgggcatt tgtataagac aaactatctc acacatcgac aaaccaatac aatcatagat 300
gtgggttctga gtccgtctca tgggaattgaa ctatctgttg gagaaaagct tgtctttaa 360
50 tgtacagcaa gaactgaact aaatgtgggg attgacttca actgggaata cccttcttcg 420
aagcatcagc ataagaaact tgtaaaccga gacctaaaaa cccagtctgg gagtgagatg 480
aagaaatttt tgagcacctt aactatagat ggtgtaaccc ggagtgacca aggattgtac 540
55 acctgtgcag catccagtgg gctgatgacc aagaagaaca gcacatttgt caggggccat 600
gaaaaacctt ttgttgcttt tgggaagtggc atggaatctc tgggtggaagc cacgggtggg 660
gagcgtgtca gaatccctgc gaagtacctt ggttaccac cccagaaat aaaatggtat 720
60 aaaaatggaa tacccttga gtccaatcac acaattaaag cggggcatgt actgacgatt 780
atggaagtga gtgaaagaga cacaggaaat tacactgtca tccttacaa tccatttca 840
65 aaggagaagc agagccatgt ggtctctctg cgtgtgtatg tcccaccg 888

ES 2 648 809 T3

<210> 3
 <211> 296
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

10	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	1	5	10	15
	Met	Thr	Glu	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	20	25	30	
15	Asn	Ile	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	35	40	45	
20	Asp	Gly	Lys	Arg	Ile	Ile	Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	50	55	60	
25	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	65	70	75	80
	Asn	Gly	His	Leu	Tyr	Lys	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Asn	85	90	95	
30	Thr	Ile	Ile	Asp	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser	100	105	110	
35	Val	Gly	Glu	Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	115	120	125	
40	Val	Gly	Ile	Asp	Phe	Asn	Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His	130	135	140	
	Lys	Lys	Leu	Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	145	150	155	160
45	Lys	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	165	170	175	
50	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	180	185	190	

ES 2 648 809 T3

	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Pro	Phe	Val	Ala	Phe	Gly	
			195					200					205				
5	Ser	Gly	Met	Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Ala	Thr	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Arg	
	210					215					220						
10	Ile	Pro	Ala	Lys	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Pro	Pro	Pro	Glu	Ile	Lys	Trp	Tyr	
	225					230					235					240	
15	Lys	Asn	Gly	Ile	Pro	Leu	Glu	Ser	Asn	His	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	His	
				245					250						255		
20	Val	Ile	Leu	Thr	Asn	Pro	Ile	Ser	Lys	Glu	Lys	Gln	Ser	His	Val	Val	
			275					280					285				
25	Ser	Leu	Pro	Val	Tyr	Val	Pro	Pro									
	290						295										

<210> 4

<211> 888

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

35	ggtagacctt	tcgtagagat	gtacagtga	atccccgaaa	ttatacacat	gactgaagga	60
	agggagctcg	tcattccctg	ccgggttacg	tcacctaaca	tcactgttac	tttaaaaaag	120
	tttccacttg	acactttgat	ccctgatgga	aaacgcataa	tctgggacag	tagaaagggc	180
40	ttcatcatat	caaatgcaac	gtacaaagaa	atagggcttc	tgacctgtga	agcaacagtc	240
	aatgggcatt	tgtataagac	aaactatctc	acacatcgac	aaaccaatac	aatcatagat	300
	gtggttctga	gtccgtctca	tggaattgaa	ctatctgttg	gagaaaagct	tgtctttaat	360
45	tgtacagcaa	gaactgaact	aatgtgggg	attgacttca	actgggaata	cccttcttcg	420
	aagcatcagc	ataagaaact	tgtaaaccga	gacctaaaaa	cccagtctgg	gagtgagatg	480
	aagaaatttt	tgagcacctt	aactatagat	ggtgtaaccc	ggagtgacca	aggattgtac	540
50	acctgtgcag	catccagtgg	gctgatgacc	aagaagaaca	gcacatttgt	caggggccat	600
	gaaaaacctt	ttgttgcttt	tggaagtggc	atggaatctc	tggtggaagc	cacgggtggg	660
	gagcgtgtca	gaatccctgc	gaagtacctt	ggttaccac	ccccagaaat	aaaatggtat	720
55	aaaaatggaa	tacccttgga	gtccaatcac	acaattaaag	cggggcatgt	actgacgatt	780
	atggaagtga	gtgaaagaga	cacaggaaat	tacactgtca	tccttaccaa	tccattttca	840
60	aaggagaagc	agagccatgt	ggtctctctg	cctgtgtatg	tcccaccg		888

65

ES 2 648 809 T3

<210> 5

<211> 296

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

10	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	1	5	10	15
	Met	Thr	Glu	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	20	25	30	
15	Asn	Ile	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	35	40	45	
20	Asp	Gly	Lys	Arg	Ile	Ile	Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	50	55	60	
25	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	65	70	75	
	Asn	Gly	His	Leu	Tyr	Lys	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Asn	85	90	95	
30	Thr	Ile	Ile	Asp	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser	100	105	110	
35	Val	Gly	Glu	Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	115	120	125	
40	Val	Gly	Ile	Asp	Phe	Asn	Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His	130	135	140	
	Lys	Lys	Leu	Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	145	150	155	
45	Lys	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	165	170	175	
50	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	180	185	190	
55	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Pro	Phe	Val	Ala	Phe	Gly	195	200	205	
	Ser	Gly	Met	Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Ala	Thr	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Arg	210	215	220	

ES 2 648 809 T3

Ile Pro Ala Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr
 225 230 235 240

5 Lys Asn Gly Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His
 245 250 255

10 Val Leu Thr Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr
 260 265 270

15 Val Ile Leu Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val
 275 280 285

Ser Arg Pro Val Tyr Val Pro Pro
 290 295

20 <210> 6
 <211> 888
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 6

30 ggtagacctt tcgtagagat gtacagtga atccccgaaa ttatacacat gactgaagga 60
 agggagctcg tcattccctg ccgggttacg tcacctaaca tcactgttac tttaaaaaag 120
 tttccacttg acactttgat ccctgatgga aaacgcataa tctgggacag tagaaagggc 180
 ttcatcatat caaatgcaac gtacaaagaa atagggcttc tgacctgtga agcaacagtc 240
 35 aatgggcatt tgtataagac aaactatctc acacatcgac aaaccaatac aatcatagat 300
 gtggttctga gtccgtctca tggaattgaa ctatctgttg gagaaaagct tgtcttaaat 360
 tgtacagcaa gaactgaact aaatgtggg attgacttca actgggaata cccttcttcg 420
 40 aagcatcagc ataagaaact tgtaaaccca gacctaataa cccagtctgg gactgagatg 480
 aagaaatttt tgagcacctt aactatagat ggtgtaaccc ggagtgaacca aggattgtac 540
 acctgtgcag catccagtgg gctgatgacc aagaagaaca gcacatttgt cagggtccat 600
 45 gaaaaacctt ttgttgcttt tggaagtggc atggaatctc tgggtggaagc cacggtgggg 660
 gagcgtgtca gaatccctgc gaagtacctt ggttaccac cccagaaat aaaatggtat 720
 50 aaaaatggaa tacccttga gtccaatcac acaattaaag cggggcatgt actgacgatt 780
 atggaagtga gtgaaagaga cacaggaaat tacactgtca tccttacaa tcccatttca 840
 aaggagaagc agagccatgt ggtctctcgt cctgtgtatg tcccaccg 888

55 <210> 7
 <211> 227
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens
 <400> 7

ES 2 648 809 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 5 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 10 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 15 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 20 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 25 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 30 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 35 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 40 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 45 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 50 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 55 Pro Gly Lys
 225
 <210> 8
 <211> 228
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 65

ES 2 648 809 T3

[illegible]

ES 2 648 809 T3

	Glu	Leu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Thr	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Arg	Cys	
	1				5					10					15		
5	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	
				20					25					30			
10	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Ala	
			35					40					45				
15	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
		50					55					60					
20	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	
	65					70					75					80	
25	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Lys	Trp	Tyr	Val	
					85					90					95		
30	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
				100					105					110			
35	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	
			115					120					125				
40	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	
		130					135					140					
45	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	
	145					150					155					160	
50	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	
					165					170					175		
55	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
				180					185					190			
60	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	
			195					200					205				
65	Asn	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	
		210					215					220					
70	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Ile	Phe	
	225					230					235					240	
75	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	
					245					250					255		
80	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
				260													

ES 2 648 809 T3

<210> 10
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 10

10	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe	1 5 10 15
15	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	20 25 30
20	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	35 40 45
25	Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	50 55 60
30	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser	65 70 75 80
35	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	85 90 95
40	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser	100 105 110
45	Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro	115 120 125
50	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln	130 135 140
55	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala	145 150 155 160
60	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	165 170 175
	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu	180 185 190
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	195 200 205
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser	210 215 220
	Leu Ser Pro Gly Lys	225

ES 2 648 809 T3

<210> 11
 <211> 1578
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia codificante para la proteína de fusión KH01

	<400> 11	
	ggtagacctt tcgtagagat gtacagtga atccccgaaa ttatacacat gactgaagga	60
10	agggagctcg tcattccctg ccgggttacg tcacctaaca tcactgttac tttaaaaaag	120
	tttccacttg acactttgat ccctgatgga aaacgcataa tctgggacag tagaaagggc	180
15	ttcatcatat caaatgcaac gtacaaagaa atagggcttc tgacctgtga agcaacagtc	240
	aatgggcatt tgtataagac aaactatctc acacatcgac aaaccaatac aatcatagat	300
	gtggttctga gtccgtctca tggaattgaa ctatctgttg gagaaaagct tgtcttaaat	360
20	tgtacagcaa gaactgaact aaatgtgggg attgacttca actgggaata cccttcttcg	420
	aagcatcagc ataagaaact tgtaaaccca gacctaaaaa occagtctgg gagtgagatg	480
	aagaaatddd tgagcacctt aactatagat ggtgtaaccg ggagtgaaca aggattgtac	540
25	acctgtgcag catccagtgg gctgatgacc aagaagaaca gcacatttgt caggggccat	600
	gaaaaacctt ttgttgcttt tggaagtggc atggaatctc tgggtggaagc cacgggtggg	660
	gagcgtgtca gaatccctgc gaagtacctt gggtacccac cccagaaat aaaatggtat	720
30	aaaaatggaa tacccttga gtccaatcac acaattaaag cggggcatgt actgacgatt	780
	atggaagtga gtgaaagaga cacaggaaat tacactgtca tccttaccaa tccatttca	840
35	aaggagaagc agagccatgt ggtctctctg gttgtgtatg tcccaccggg cccgggagc	900
	aaaactcaca catgccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc	960
	ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	1020
40	gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	1080
	gtggagggtg ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	1140
	gtgggtcagc toctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1200
45	aagggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaagg	1260
	cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	1320
50	cagggtcagc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatcca gcgacatcg cgtggagtgg	1380
	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac	1440
	ggctccttct toctctatag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggc gcaggggaac	1500
55	gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1560
	tcctgtctc cgggtaaa	1578

60

ES 2 648 809 T3

<210> 12
 <211> 526
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> proteína de fusión KH01

<400> 12

10

Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His
 1 5 10 15

15

Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro
 20 25 30

20

Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro
 35 40 45

Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser
 50 55 60

25

Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val
 65 70 75 80

30

Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn
 85 90 95

Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser
 100 105 110

35

Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn
 115 120 125

40

ES 2 648 809 T3

	Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His	130	135	140
5	Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met	145	150	155
	Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp	165	170	175
10	Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys	180	185	190
15	Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly	195	200	205
	Ser Gly Met Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg	210	215	220
20	Ile Pro Ala Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr	225	230	235
25	Lys Asn Gly Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His	245	250	255
	Val Leu Thr Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr	260	265	270
30	Val Ile Leu Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val	275	280	285
35	Ser Leu Val Val Tyr Val Pro Pro Gly Pro Gly Asp Lys Thr His Thr	290	295	300
40	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe	305	310	315
	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	325	330	335
45	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val	340	345	350
50	Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	355	360	365
55	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val	370	375	380
60				

ES 2 648 809 T3

	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
	385					390					395					400
5	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
					405					410					415	
10	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
				420					425					430		
15	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
			435					440					445			
20	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
		450					455					460				
25	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
	465					470					475					480
30	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
					485					490					495	
35	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
				500					505					510		
40	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
			515					520					525			

<210> 13
 <211> 1578
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia codificante para la proteína de fusión KH02

<400> 13

45	g	g	t	a	c	a	c	t	t		t	c	g	t	a	g	a	g	a		t	t	a	c	a	c	a	t		g	a	c	t	g	a	a	g	a		60				
	a	g	g	g	a	g	c	t	c	g		t	c	a	t	t	c	c	c	t	g		c	c	g	g	t	t	a	c	a		t	c	a	c	t	g	t	t	a	c	a	
50	t	t	t	c	c	a	c	t	t	g	a		a	c	a	c	t	t	t	g	a		c	c	c	t	g	a	t	g	a		a	a	c	g	c	a	t	a	a		180	
	t	t	c	a	t	c	a	t	a		c	a	a	t	g	c	a	a	c		g	t	a	c	a	a	g	a	a		a	t	a	g	g	g	c	t	t	c		240		
	a	a	t	g	g	g	c	a	t		t	g	t	a	a	g	a	c		a	a	a	c	a	a	t	a	c		a	a	t	c	a	t	a	g	a	t		300			
55	g	t	g	g	t	t	c	t	g	a		g	t	c	c	g	t	c	t	c	a		t	g	g	a	a	t	t	g	a		c	t	a	t	c	t	g	t	g	a		360
	t	g	t	a	c	a	g	c	a		g	a	a	c	t	g	a	a	c	t		a	a	a	t	g	t	g	g	g		a	t	t	g	a	c	t	t	c	a		420	
	a	a	g	c	a	t	c	a	g	c		a	t	a	g	a	a	a	c	t		t	g	t	a	a	c	c	g	a		g	a	c	c	t	a	a	a	a	a		480	

ES 2 648 809 T3

aagaaatttt tgagcacctt aactatagat ggtgtaaccc ggagtgacca aggattgtac 540
 acctgtgcag catccagtgg gctgatgacc aagaagaaca gcacatttgt caggggccat 600
 5 gaaaaacctt ttgttgcttt tggaagtggc atggaatctc tgggtggaagc cacggtgggg 660
 gagcgtgtca gaatccctgc gaagtacctt ggttaccac cccagaaaat aaaatggtat 720
 aaaaatggaa tacccttga gtccaatcac acaattaaag cggggcatgt actgacgatt 780
 10 atggaagtga gtgaaagaga cacagaaaat tacactgtca tccttaccaa tcccatttca 840
 aaggagaagc agagccatgt ggtctctctg cgtgtgtatg tcccaccggg cccgggagac 900
 aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 960
 15 ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 1020
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtc cgtggacggc 1080
 20 gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 1140
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1200
 aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 1260
 25 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1320
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatcca gcgacatcg cgtggagtgg 1380
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgctgt ggactccgac 1440
 30 ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1500
 gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1560
 35 tcctgtctc cgggtaaa 1578

<210> 14

<211> 526

<212> PRT

40 <213> secuencia artificial

<220>

<223> proteína de fusión KH02

45 <400> 14

Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His
 1 5 10 15

50 Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro
 20 25 30

55 Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro
 35 40 45

Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser
 50 55 60

60

ES 2 648 809 T3

	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	65	70	75	80
5	Asn	Gly	His	Leu	Tyr	Lys	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Asn	85	90	95	
10	Thr	Ile	Ile	Asp	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser	100	105	110	
	Val	Gly	Glu	Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	115	120	125	
15	Val	Gly	Ile	Asp	Phe	Asn	Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His	130	135	140	
20	Lys	Lys	Leu	Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	145	150	155	160
25	Lys	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	165	170	175	
	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	180	185	190	
30	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Pro	Phe	Val	Ala	Phe	Gly	195	200	205	
35	Ser	Gly	Met	Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Ala	Thr	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Arg	210	215	220	
40	Ile	Pro	Ala	Lys	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Pro	Pro	Pro	Glu	Ile	Lys	Trp	Tyr	225	230	235	240
	Lys	Asn	Gly	Ile	Pro	Leu	Glu	Ser	Asn	His	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	His	245	250	255	
45	Val	Leu	Thr	Ile	Met	Glu	Val	Ser	Glu	Arg	Asp	Thr	Gly	Asn	Tyr	Thr	260	265	270	
50	Val	Ile	Leu	Thr	Asn	Pro	Ile	Ser	Lys	Glu	Lys	Gln	Ser	His	Val	Val	275	280	285	
	Ser	Leu	Arg	Val	Tyr	Val	Pro	Pro	Gly	Pro	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	290	295	300	
55	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe				

ES 2 648 809 T3

	305		310		315		320
5	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	325		330		335	
10	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val	340		345		350	
	Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	355		360		365	
15	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val	370		375		380	
20	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	385		390		395	400
25	Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser	405		410		415	
	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	420		425		430	
30	Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	435		440		445	
35	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	450		455		460	
40	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	465		470		475	480
	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	485		490		495	
45	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His	500		505		510	
50	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	515		520		525	
55	<210> 15						
	<211> 1578						
	<212> ADN						
	<213> secuencia artificial						
60	<220>						
	<223> secuencia codificante para la proteína de fusión KH03						
	<400> 15						

ES 2 648 809 T3

	ggtagacctt tcgtagagat gtacagtga atccccgaaa ttatacacat gactgaagga	60
	agggagctcg tcattccctg ccgggttacg tcacctaaca tcaactgttac tttaaaaaag	120
5	tttccacttg acactttgat ccctgatgga aaacgcataa tctgggacag tagaaagggc	180
	ttcatcatat caaatgcaac gtacaaagaa atagggtctc tgacctgtga agcaacagtc	240
10	aatgggcatt tgtataagac aaactatctc acacatcgac aaaccaatac aatcatagat	300
	gtgggttctga gtccgtctca tggaattgaa ctatctgttg gagaaaagct tgtcttaaat	360
	tgtacagcaa gaactgaact aaatgtgggg attgacttca actgggaata cccttcttcg	420
15	aagcatcagc ataagaaact tgtaaaccga gacctaaaaa cccagtctgg gagtgagatg	480
	aagaaatttt tgagcacctt aactatagat ggtgtaaccc ggagtgacca aggattgtac	540
	acctgtgcag catccagtgg gctgatgacc aagaagaaca gcacatttgt cagggtccat	600
20	gaaaaacctt ttgttgcttt tggaagtggc atggaatctc tgggtggaagc cacggtgggg	660
	gagcgtgtca gaatccctgc gaagtacctt gggtaccac cccagaaat aaaatggtat	720
	aaaaatggaa tacccttga gtccaatcac acaattaaag cggggcatgt actgacgatt	780
25	atggaagtga gtgaaagaga cacaggaaat tacactgtca tccttaccaa tccatttca	840
	aaggagaagc agagccatgt ggtctctctg cctgtgtatg tcccaccggg cccgggcgac	900
30	aaaactcaca catgcccacc gtgccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc	960
	ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	1020
	gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	1080
35	gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	1140
	gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1200
	aaggctctca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg	1260
40	cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	1320
	caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcg cgtggagtgg	1380
	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac	1440
45	ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac	1500
	gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1560
50	tcctgtctc cgggtaaa	1578

<210> 16

<211> 526

<212> PRT

55 <213> secuencia artificial

<220>

<223> proteína de fusión KH03

60 <400> 16

65

ES 2 648 809 T3

	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	
	1				5					10					15		
5	Met	Thr	Glu	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	
				20					25					30			
10	Asn	Ile	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	
			35					40					45				
15	Asp	Gly	Lys	Arg	Ile	Ile	Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	
	50						55					60					
20	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	
	65					70					75					80	
25	Thr	Ile	Ile	Asp	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser	
				100					105					110			
30	Val	Gly	Glu	Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	
			115					120					125				
35	Lys	Lys	Leu	Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	
	145					150					155					160	
40	Lys	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	
					165					170					175		
45	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	
				180					185					190			
50	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Pro	Phe	Val	Ala	Phe	Gly	
			195					200						205			
55	Ser	Gly	Met	Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Ala	Thr	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Arg	
	210						215					220					
	Ile	Pro	Ala	Lys	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Pro	Pro	Pro	Glu	Ile	Lys	Trp	Tyr	
	225					230					235					240	

ES 2 648 809 T3

	Lys	Asn	Gly	Ile	Pro	Leu	Glu	Ser	Asn	His	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	His
					245					250					255	
5	Val	Leu	Thr	Ile	Met	Glu	Val	Ser	Glu	Arg	Asp	Thr	Gly	Asn	Tyr	Thr
				260					265					270		
10	Val	Ile	Leu	Thr	Asn	Pro	Ile	Ser	Lys	Glu	Lys	Gln	Ser	His	Val	Val
			275					280					285			
15	Ser	Leu	Pro	Val	Tyr	Val	Pro	Pro	Gly	Pro	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr
		290					295					300				
20	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
	305					310					315					320
25	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
					325					330					335	
30	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
				340					345					350		
35	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
			355					360					365			
40	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
		370					375					380				
45	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
	385					390					395					400
50	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
				405						410					415	
55	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
				420					425					430		
60	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
		435						440					445			
65	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
		450					455					460				
70	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
	465					470					475					480
75	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
					485					490					495	
80	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
				500					505					510		
85	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
			515					520					525			

<210> 17
 <211> 1578
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia codificante para la proteína de fusión KH04

<400> 17

10	ggtagacctt tcgtagagat gtacagtga atccccgaaa ttatacacat gactgaagga	60
	agggagctcg tcattccctg ccgggttacg tcacctaaca tcactgttac tttaaaaaag	120
15	tttccacttg acactttgat ccctgatgga aaacgcataa tctgggacag tagaaagggc	180
	ttcatcatat caaatgcaac gtacaaagaa atagggcttc tgacctgtga agcaacagtc	240
	aatgggcatt tgtataagac aaactatctc acacatcgac aaaccaatac aatcatagat	300
20	gtggttctga gtccgtctca tggaattgaa ctatctgttg gagaaaagct tgtcttaaat	360
	tgtacagcaa gaactgaact aaatgtggg attgacttca actgggaata cccttcttcg	420
	aagcatcagc ataagaaact tgtaaaccga gacctaaaaa cccagtctgg gactgagatg	480
25	aagaaatttt tgagcacctt aactatagat ggtgtaaccc ggagtgacca aggattgtac	540
	acctgtgcag catccagtgg gctgatgacc aagaagaaca gcacatttgt cagggtccat	600
	gaaaaacctt ttgttgcttt tggaagtggc atggaatctc tgggtggaagc cacggtgggg	660
30	gagcgtgtca gaatccctgc gaagtacctt gggtacccac cccagaaat aaaatggtat	720
	aaaaatggaa tacccttgta gtccaatcac acaattaaag cggggcatgt actgacgatt	780
35	atggaagtga gtgaaagaga cacaggaaat tacactgtca tccttacaa tcccatttca	840
	aaggagaagc agagccatgt ggtctctcgt cctgtgtatg tcccaccggg cccgggagc	900
	aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc	960
40	ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	1020
	gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	1080
	gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	1140
45	gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1200
	aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccactctcaa agccaaaggg	1260
	cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	1320
50	caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg	1380
	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac	1440
55	ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	1500
	gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1560
	tccctgtctc cgggtaaa	1578

60

<210> 18
 <211> 526
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

65

ES 2 648 809 T3

<220>

<223> proteína de fusión KH04

<400> 18

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

ES 2 648 809 T3

	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	
				180					185					190			
5	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Pro	Phe	Val	Ala	Phe	Gly	
			195					200					205				
10	Ser	Gly	Met	Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Ala	Thr	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Arg	
		210					215					220					
	Ile	Pro	Ala	Lys	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Pro	Pro	Pro	Glu	Ile	Lys	Trp	Tyr	
	225					230					235					240	
15	Lys	Asn	Gly	Ile	Pro	Leu	Glu	Ser	Asn	His	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	His	
					245					250					255		
20	Val	Leu	Thr	Ile	Met	Glu	Val	Ser	Glu	Arg	Asp	Thr	Gly	Asn	Tyr	Thr	
				260					265					270			
	Val	Ile	Leu	Thr	Asn	Pro	Ile	Ser	Lys	Glu	Lys	Gln	Ser	His	Val	Val	
			275					280					285				
25	Ser	Arg	Pro	Val	Tyr	Val	Pro	Pro	Gly	Pro	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
		290					295					300					
30	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
	305					310					315					320	
	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
					325					330					335		
35	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
				340					345					350			
40	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
			355					360					365				
45	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
		370					375					380					
	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
	385					390					395					400	
50	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
					405					410					415		
55	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
				420					425					430			

60

65

ES 2 648 809 T3

	Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	
	435 440 445	
5	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	
	450 455 460	
10	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	
	465 470 475 480	
15	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	
	485 490 495	
20	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His	
	500 505 510	
25	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	515 520 525	
30	<210> 19 <211> 1578 <212> ADN <213> secuencia artificial	
35	<220> <223> secuencia codificante para la proteína de fusión KH05 <400> 19	
35	ggtagacctt tcgtagagat gtacagtga atccccgaaa ttatacacat gactgaagga	60
	agggagctcg tcattccctg ccgggttacg tcacctaaca tcaactgttac tttaaaaaag	120
	tttccacttg acactttgat ccctgatgga aaacgcataa tctgggacag tagaaagggc	180
40	ttcatcatat caaatgcaac gtacaaagaa atagggcttc tgacctgtga agcaacagtc	240
	aatgggcatt tgtataagac aaactatctc acacatcgac aaaccaatac aatcatagat	300
	gtggttctga gtccgtctca tggaattgaa ctatctgttg gagaaaagct tgtcttaaat	360
45	tgtacagcaa gaactgaact aaatgtggg attgacttca actgggaata cccttcttcg	420
	aagcatcagc ataagaaact tgtaaaccca gacctaaaaa cccagtctgg gactgagatg	480
50	aagaaatddd tgagcacctt aactatagat ggtgtaaccc ggagtgacca aggattgtac	540
	acctgtgcag catccagtgg gctgatgacc aagaagaaca gcacatttgt cagggtccat	600
	gaaaaccttt ctgttgcttt tggaagtggc atggaatctc tgggtggaagc cacggtgggg	660
55	gagcgtgtca gaatccctgc gaagtacctt ggttaccac cccagaaaat aaaatggtat	720
	aaaaatggaa tacccttga gtccaatcac acaattaaag cggggcatgt actgacgatt	780
60	atggaagtga gtgaaagaga cacaggaaat tacactgtca tccttaccaa tcccatttca	840

ES 2 648 809 T3

	aaggagaagc agagccatgt ggtctctctg gttgtgtatg tcccaccggg cccggggcgac	900
	aaaactcaca catgccact gtgccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc	960
5	ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	1020
	gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	1080
10	gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	1140
	gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1200
	aagggtctcca acaaagccct ccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg	1260
15	cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	1320
	caggtcagcc tgacctgcct agtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg	1380
	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aaggccacgc ctcccgtgct ggactccgac	1440
20	ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	1500
	gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1560
25	tccctgtctc cgggtaaa	1578
	<210> 20	
	<211> 476	
	<212> PRT	
30	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> proteína de fusión KH05	
35	<400> 20	
	Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala	
	1 5 10 15	
40	Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly	
	20 25 30	
45	His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile	
	35 40 45	
50	Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly	
	50 55 60	
55	Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly	
	65 70 75 80	
60	Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys	
	85 90 95	
	Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys	
	100 105 110	

ES 2 648 809 T3

	Phe	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	
			115					120					125				
5	Leu	Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	
		130					135					140					
10	Thr	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Pro	Phe	Val	Ala	Phe	Gly	Ser	Gly	
	145					150					155					160	
	Met	Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Ala	Thr	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Arg	Ile	Pro	
				165						170					175		
15	Ala	Lys	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Pro	Pro	Pro	Glu	Ile	Lys	Trp	Tyr	Lys	Asn	
				180					185					190			
20	Gly	Ile	Pro	Leu	Glu	Ser	Asn	His	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	His	Val	Leu	
			195					200					205				
25	Thr	Ile	Met	Glu	Val	Ser	Glu	Arg	Asp	Thr	Gly	Asn	Tyr	Thr	Val	Ile	
		210					215					220					
	Leu	Thr	Asn	Pro	Ile	Ser	Lys	Glu	Lys	Gln	Ser	His	Val	Val	Ser	Leu	
	225					230				235						240	
30	Val	Val	Tyr	Val	Pro	Pro	Gly	Pro	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	
					245					250					255		
35	Leu	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	
				260					265					270			
	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
			275					280					285				
40	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	
		290					295					300					
45	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	
	305					310					315					320	
50	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	
					325					330					335		
	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	
				340					345					350			
55	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	
60																	

ES 2 648 809 T3

	355		360		365	
5	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	370	375		380	
10	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	385	390		395	400
15	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	405		410		415
20	Glu Asn Asn Tyr Lys Ala Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	420		425		430
25	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln	435		440		445
30	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	450		455		460
35	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	465		470		475
40	<210> 21					
	<211> 954					
	<212> ADN					
	<213> secuencia artificial					
45	<220>					
	<223> fragmento sintético 1					
50	<400> 21					
55	gccaccatgg tcagctactg ggacaccggg gtcctgctgt gcgcgctgct cagctgtctg					60
	cttctcacag gatctagttc cggaggtaga cctttcgtag agatgtacag tgaaatcccc					120
	gaaattatac acatgactga aggaagggag ctcgtcattc cctgccgggt tacgtcacct					180
	aacatcactg ttacttttaa aaagtttcca cttgacactt tgatccctga tggaaaacgc					240
	ataatctggg acagtagaaa gggcttcatc atatcaaag caacgtacaa agaaataggg					300
	cttctgacct gtgaagcaac agtcaatggg catttgtata agacaaacta tctcacacat					360
	cgacaaacca atacaatcat agatgtggtt ctgagtcctg ctcattggaat tgaactatct					420
	gttgagagaaa agcttgtctt aaattgtaca gcaagaactg aactaaatgt ggggattgac					480
	ttcaactggg aatacccttc ttcgaagcat cagcataaga aacttgtaaa ccgagaccta					540
	aaaaccacgt ctgggagtga gatgaagaaa tttttgagca ccttaactat agatggtgta					600
	acccggagtg accaaggatt gtacacctgt gcagcatcca gtgggctgat gaccaagaag					660
60	aacagcacat ttgtcagggt ccatgaaaaa ccttttggtt cttttggaag tggcatggaa					720
65						

ES 2 648 809 T3

	tctctggtgg aagccacggt gggggagcgt gtcagaatcc ctgcgaagta ccttggttac	780
	ccacccccag aaataaaatg gtataaaaat ggaatacccc ttgagtccaa tcacacaatt	840
5	aaagcggggc atgtactgac gattatggaa gtgagtgaag gagacacagg aaattacact	900
	gtcatcctta ccaatcccat ttcaaaggag aagcagagcc atgtggtctc tctg	954
10	<210> 22	
	<211> 708	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> fragmento sintético 2	
20	<400> 22	
	gtgtatgtcc caccggggccc gggcgacaaa actcacacat gccacacgtg cccagcacct	60
	gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttccccccaa aacccaagga caccctcatg	120
25	atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag	180
	gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg	240
	gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac	300
30	tggtctgaatg gcaaggagta caagtgcgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc	360
	gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc	420
	ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc	480
35	tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag	540
	accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gtcaccgtg	600
40	gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg	660
	cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga	708
45	<210> 23	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> cebador hacia el extremo 5' de longitud completa, P1	
	<400> 23	
	atacctaggg ccaccatggt cagctactg	29
55	<210> 24	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> cebador hacia el extremo 3' de longitud completa, P2	
	<400> 24	
65	actgtatact catttaccg gagacaggga g	31

<210> 25
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> no mutante cebador hacia el extremo 5', P3
 <400> 25
 10 cagagccatg tggctctct ggtgtgtat gtccaccgg gcccgggc 48
 <210> 26
 <211> 49
 <212> ADN
 15 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador hacia el extremo 3' no mutante, P4
 20 <400> 26
 gcccgggccc ggtgggacat acacaaccag agagaccaca tggctctgc 49
 <210> 27
 <211> 48
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador hacia el extremo 5' para producir la sec. con núm. de ident.: 2, P5
 30 <400> 27
 cagagccatg tggctctct gcgtgtgtat gtccaccgg gcccgggc 48
 <210> 28
 <211> 49
 35 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 40 <223> cebador hacia el extremo 3' para producir la sec. con núm. de ident.: 2, P6
 <400> 28
 gcccgggccc ggtgggacat acacacgcag agagaccaca tggctctgc 49
 45 <210> 29
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador hacia el extremo 5' para producir la sec. con núm. de ident.: 4, P7
 <400> 29
 55 cagagccatg tggctctct gcctgtgtat gtccaccgg gcccgggc 48
 <210> 30
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 60 <220>
 <223> cebador hacia el extremo 3' para producir la sec. con núm. de ident.: 4, P8
 <400> 30
 65 gcccgggccc ggtgggacat acacaggcag agagaccaca tggctctg 48

ES 2 648 809 T3

<210> 31
<211> 48
<212> ADN
<213> secuencia artificial

5
<220>
<223> cebador hacia el extremo 5' para producir la sec. con núm. de ident.: 6, P9

<400> 31
10 cagagccatg tggctctcg tcctgtgtat gtcccaccgg gcccgggc 48

<210> 32
<211> 46
<212> ADN
15 <213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador hacia el extremo 3' para producir la sec. con núm. de ident.: 6, P10

20 <400> 32
gcccgggccc ggtgggacat acacaggacg agagaccaca tggctc 46

Reivindicaciones

1. Una proteína de fusión para la inhibición de la angiogénesis o el crecimiento vascular, compuesta por un fragmento del receptor de VEGF humano y un fragmento Fc de inmunoglobulina humana unido a este, en donde la proteína de fusión es KH02, cuya secuencia de aminoácidos es la sec. con núm. de ident.: 14.
2. Una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1.
3. La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 2 en donde la secuencia de nucleótidos es la sec. con núm. de ident.: 13.
4. Un vector de expresión o célula huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 y que expresa la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1.
5. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el vector de expresión es un vector de expresión eucariota o un vector de expresión viral.
6. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el vector de expresión eucariota es un vector de expresión de células de mamífero.
7. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el vector de expresión es un vector viral adenoasociado o un vector de adenovirus.
8. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la célula huésped es una célula CHO o una célula 293.
9. Un método para preparar la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende introducir el vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 en una célula huésped adecuada, y expresar la proteína de fusión.
10. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la forma de dosificación de la formulación de la composición farmacéutica es una inyección, un polvo para inyección liofilizado o un gel oftálmico.
12. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 para usar en un método para tratar una enfermedad provocada por angiogénesis o crecimiento vascular.
13. La proteína de fusión o composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la enfermedad provocada por angiogénesis o crecimiento vascular es un tumor o una enfermedad provocada por angiogénesis en el ojo.
14. La proteína de fusión o composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la enfermedad provocada por la angiogénesis en el ojo es degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, o coriorretinopatía.
15. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 para usar en la terapia.

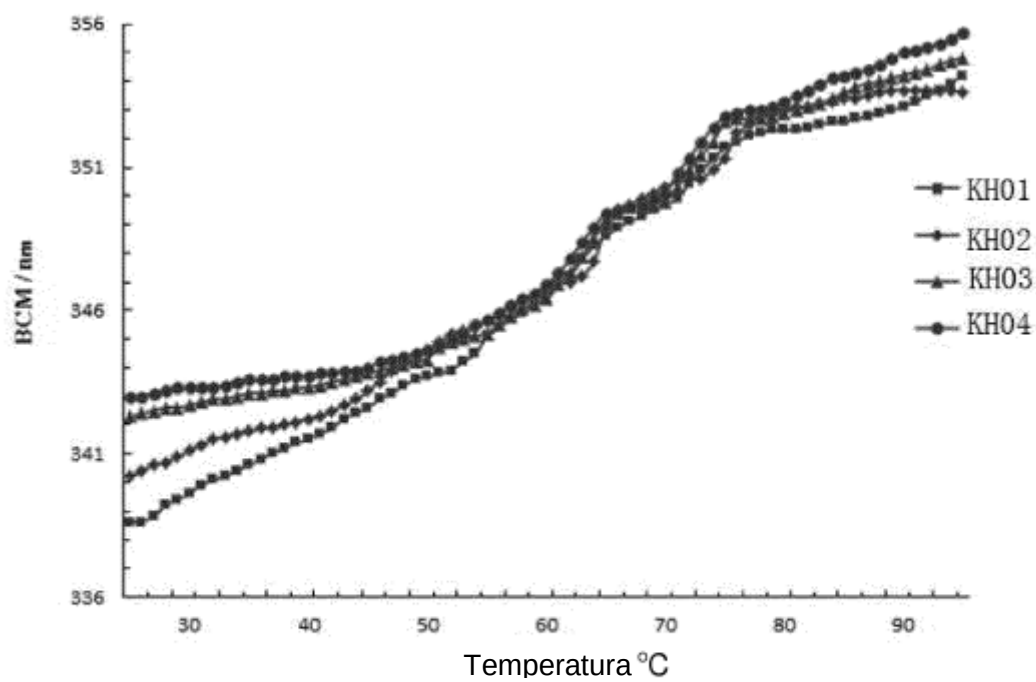


Figura 1

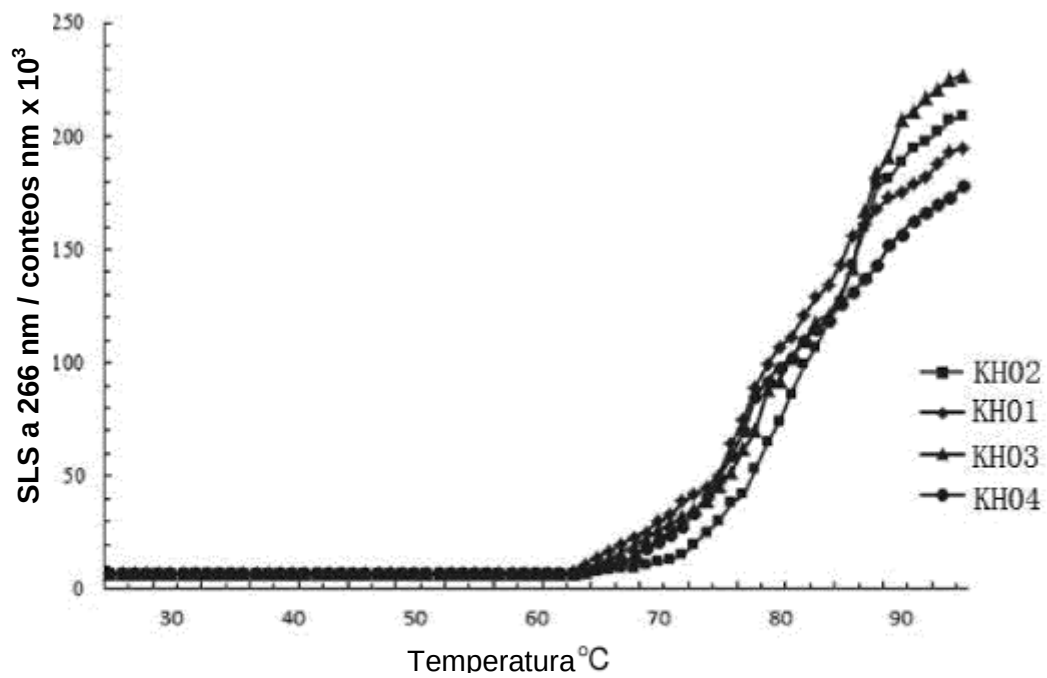


Figura 2

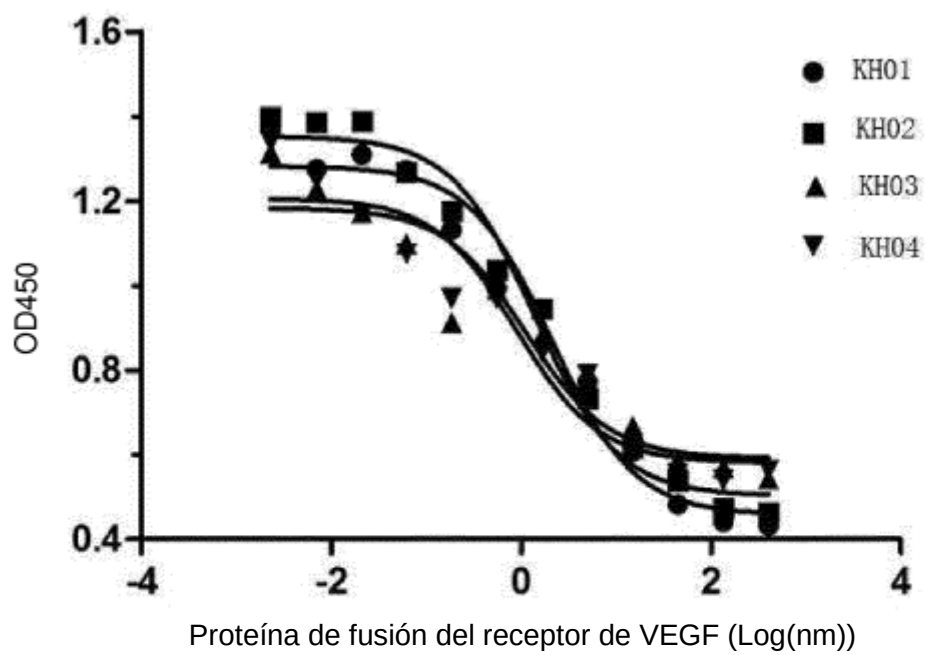


Figura 3

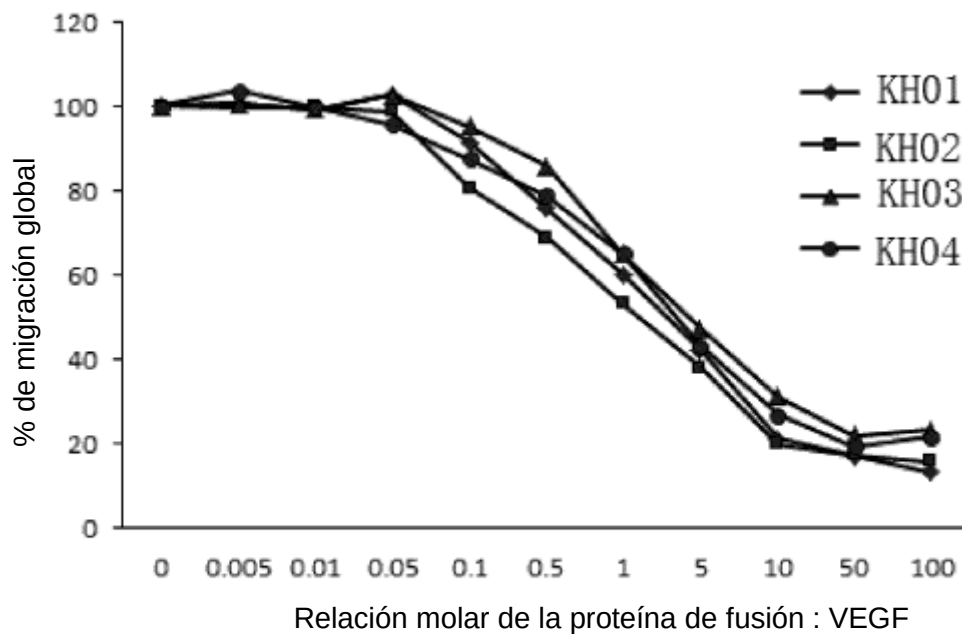


Figura 4