(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 684 349**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2014** **PCT/US2014/022102**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014** **WO14138687**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014** **E 14713728 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018** **EP 2964250**

(54) Título: **Péptidos y composiciones para el tratamiento de daños de las articulaciones.**

(30) Prioridad:

08.03.2013 US 201361775400 P
10.02.2014 US 201461938123 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.10.2018

(73) Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

(72) Inventor/es:

JOHNSON, KRISTEN y
SHI, JIAN

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 684 349 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

Péptidos y composiciones para el tratamiento de daños de las articulaciones

Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reclama prioridad para el beneficio de la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 61/775,400, presentada el 8 de marzo de 2013, y la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 61/938,123, presentada el 10 de febrero de 2014, cada una de las cuales.

Antecedentes de la invención

La osteoartritis (OA) representa el trastorno musculoesquelético más común. Aproximadamente 40 millones de americanos son afectados actualmente; un número que se predice que se incrementará hasta 60 millones dentro de los siguientes veinte años como un resultado de población que está envejeciendo y del aumento en la expectativa de vida, convirtiéndola en la cuarta causa más importante de discapacidad. La osteoartritis (OA) se caracteriza por una lenta desintegración degenerativa de una articulación, incluyendo tanto el cartílago articular (que contiene las células y la matriz que producen la lubricación y acojinamiento para la articulación) como el hueso subcondral subyacente al cartílago articular. La osteoartritis (OA) se puede considerar como una consecuencia de diferentes factores etiológicos. Por ejemplo, puede ser causada por una tensión biomecánica anormal o por anormalidades genéticas o adquiridas del cartílago articular o del hueso. Las terapias actuales para la osteoartritis (OA) incluyen alivio del dolor con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) orales o inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la inyección intraarticular (IA) con agentes tales como corticosteroides y hialuronano, y los planteamientos quirúrgicos.

El daño de las articulaciones, por ejemplo, lesión aguda de la articulación, tal como un desgarre de meniscos o ligamentos, o una fractura intraarticular, también puede conducir a artritis, por ejemplo, artritis post-traumática. Debido a que el cartílago articular tiene una capacidad limitada para repararse, incluye un pequeño daño indetectable con frecuencia puede llegar a empeorar a través del tiempo y conducir a la osteoartritis (OA). Los tratamientos actuales para las lesiones de articulaciones pueden incluir cirugía y otros procedimientos invasivos enfocados en la regeneración de las articulaciones dañadas, así como en el tratamiento con agentes para reducir el dolor y la inflamación.

Las células madre mesenquimales (MSCs) están presentes en el cartílago articular adulto, y después de su aislamiento, se pueden programar *in vitro* para que experimenten la diferenciación hasta los condrocitos y otros linajes celulares mesenquimales, y se pueden utilizar para la regeneración del cartílago. En parte, el proceso es regulado por los factores de crecimiento (TGFßs, BMPs), las condiciones del suero, y el contacto de célula-célula. La Publicación Internacional Número WO2011/008773 describe composiciones peptídicas y el uso de esas composiciones para el tratamiento o la prevención de artritis y lesión de articulaciones, y para inducir la diferenciación de las células mesenquimales hasta condrocitos. Adicionalmente, la Publicación Internacional Número WO2012/129562 describe compuestos de moléculas pequeñas, composiciones y el uso de esas composiciones para mitigar la artritis y las lesiones de articulaciones, y para inducir la diferenciación de las células mesenquimales hasta condrocitos.

Aunque las técnicas quirúrgicas y la tecnología regenerativa han hecho algún progreso en la restauración del cartílago, en la ralentización de la degeneración, y en una mejor reparación del daño de las articulaciones, existe una necesidad continua de mejores composiciones y métodos para una regeneración efectiva del cartílago, el tratamiento del daño de las articulaciones, y la mitigación o prevención de la osteoartritis (OA).

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a la identificación de nuevas variantes de polipéptidos y proteínas de la angiopoietina-tipo 3 (ANGPTL3) que tienen propiedades farmacéuticas mejoradas, por ejemplo, son más estables, menos susceptibles a la proteólisis y a la degradación enzimática que la ANGPTL3 de tipo silvestre. También se proporcionan composiciones farmacéuticas y los métodos para el tratamiento del daño de las articulaciones o lesión de las articulaciones, y métodos para mitigar o prevenir la artritis, el daño de las articulaciones o la lesión de las articulaciones en un mamífero.

Por consiguiente, se proporcionan polipéptidos resistentes a la proteasa que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene cuando menos el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de una cualquiera o más de las secuencias de la Tabla 1, en donde los polipéptidos comprenden un aminoácido que es un aminoácido polar diferente de K o R en la posición 423, como se determina con referencia a la secuencia del polipéptido de ANGPTL3 de longitud completa, SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 423 como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1 es Q o S. En ciertas realizaciones, el aminoácido en la posición 423 como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1 es Q. En ciertas realizaciones, el aminoácido en la posición 423 como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1 es S. En ciertas realizaciones, el aminoácido en la posición 423

como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1 es suprimido. En adición, los polipéptidos proporcionados tienen actividad condrogénica.

En algunas realizaciones, el polipéptido provisto comprende una secuencia que tiene cuando menos el 95 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, y SEQ ID NO: 70. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia que tiene cuando menos el 95 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, y SEQ ID NO: 64. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una cualquiera de las secuencias de la Tabla 1. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, y SEQ ID NO: 70. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, y SEQ ID NO: 64. En algunas realizaciones, el polipéptido es una cualquiera de las secuencias de la Tabla 1. En algunas realizaciones, el polipéptido es una cualquiera de las SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, y SEQ ID NO: 70. En algunas realizaciones, el polipéptido es una cualquiera de las SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, y SEQ ID NO: 64.

Los polipéptidos de la invención pueden ser PEGilados. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la invención pueden comprender un péptido heterólogo como una proteína de fusión, que opcionalmente se puede fusionar en el extremo amino-terminal o carboxi-terminal del polipéptido, en donde el polipéptido se fusiona a cualquiera de las albúminas de suero humano (HSA), una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), una polihistidina, una glutatión S transferasa (GST), una tiorredoxina, una proteína A, una proteína G o una maltosa proteína de unión (MBP), o un fragmento de la misma. También se proporcionan polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención; vectores que contienen polinucleótidos que codifican los polipéptidos; y células huésped que comprenden esos vectores.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones se pueden utilizar en los métodos proporcionados en la presente, para tratar, mitigar o prevenir artritis o el daño de las articulaciones en un paciente, en donde el método comprende administrar a una articulación de un paciente, una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica de la invención. Los ejemplos de las condiciones que pueden beneficiarse a partir de estos métodos incluyen, pero no se limitan a, artritis (por ejemplo, osteoartritis, artritis traumática), y el daño de las articulaciones (por ejemplo, lesión aguda de las articulaciones).

Los usos proporcionados incluyen tratar a un sujeto que tenga o que esté en riesgo de tener daño de las articulaciones y/o artritis, los cuales comprenden administrar al sujeto, una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más polipéptidos de la invención, o una composición farmacéutica de los mismos. Todavía además se proporcionan polipéptidos de la invención para uso en métodos de inducir la diferenciación de las células madre mesenquimales hasta condrocitos.

Estos y otros aspectos de la invención, incluyendo las características, ventajas y realizaciones adicionales de la invención, se describirán y se elucidarán con mayor detalle en la siguiente descripción detallada y en las reivindicaciones adjuntas de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un esquema de proteínas de hANGPTL3 diseñadas para mejorar la estabilidad de la proteína y mejorar la resistencia proteolítica. Durante la producción de proteína de las secuencias de proteínas y péptidos de tipo silvestre, se observó una disociación del 100 % entre Lys423 y Ser424. Para mitigar la proteólisis, se generaron diversos péptidos mutantes en donde Lys 423 se mutó hasta Gln o Ser; o Ser424 se mutó hasta Thr; o Lys 423 se suprimió.

Las Figuras 2A y 2B ilustran representaciones gráficas de la expresión de las proteínas específicas de cartílago en la presencia o en ausencia de ANGPTL3 y de las construcciones diseñadas. Las células fijadas se tiñeron para 2A la cuantificación de Pro-colágeno Tipo 2A (PIIANP) o para (2B) la cuantificación de colágeno Tipo II, para determinar el porcentaje de diferenciación de las células hasta condrocitos después del tratamiento como se describe en la Ejemplificación. La Figura 2C ilustra una representación gráfica de los ensayos de cuantificación de angiogénesis en la presencia o en ausencia de ANGPTL3 o de las construcciones diseñadas, comparándose con una proteína de control positivo, bFGF. La longitud total del tubo y el número de puntos de ramificación fueron mediciones cuantitativas de la angiogénesis. Aunque otros han reportado una actividad angiogénica en ANGPTL3, y este estudio confirma la actividad así como aquélla de FGF, los resultados indicaron que no se conserva ninguna actividad significativa en una construcción de ANGPTL3 C-terminal.

La Figura 3 son representaciones gráficas que muestran un aumento en la expresión de las proteínas específicas de cartílago en la presencia de ANGPTL3 o de las construcciones diseñadas. 3A. Las células se evaluaron diez días después del tratamiento utilizando qRT-PCR para medir la expresión del ARN para las proteínas específicas de cartílago después del tratamiento como se describe. Lubricina, agrecano y Sox9 representan las proteínas relacionadas con el cartílago; IGF e IFITM1 representan el potencial de diferenciación, y osteocalcina y colágeno tipo X representan proteínas relacionadas con hueso/fibrosis. 3B. Las células se evaluaron tres días después del tratamiento como se describe. Se vio un aumento en la expresión de agrecano después del tratamiento con la construcción diseñada o con el polipéptido de la región C-terminal de ANGPTL1 de tipo silvestre.

La Figura 4 ilustra representaciones gráficas de la actividad condroprotectora de ANGPTL3 y de las construcciones diseñadas. 4A: La liberación de glucosaminoglucano (GAG), un indicador de daño de la matriz, se inhibió con el aumento de la cantidad de ANGPTL3 y de las construcciones mutantes. Se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la liberación de glucosaminoglucano (GAG) *ex vivo* (un indicador del daño de la matriz) utilizando cartílago bovino tratado en la presencia o en ausencia de las construcciones descritas. 4B y 4C: Se inhibió la liberación de NO con el aumento de la cantidad de ANGPTL3 y de las construcciones diseñadas como se indica. Los condrocitos se trataron en la presencia o en ausencia de las construcciones descritas, seguido por los ensayos de reacción de Greiss para determinar la inhibición de la liberación de NO como un indicador de la condroprotección.

La Figura 5 ilustra una representación gráfica que muestra una inhibición de la expresión de colágeno tipo X (un indicador de la actividad de formación de cartílago fibrótico), en la presencia de las construcciones bajo condiciones hipertróficas. Los condrocitos primarios se trataron en la presencia o en ausencia de las construcciones bajo condiciones hipertróficas como se describe, seguido por la determinación de la expresión de colágeno tipo X, evaluada mediante inmunofluorescencia, como una medición de la diferenciación de la formación de cartílago fibrótico e hipertrófico/condrocitos. 5A ilustra los resultados de ANGPTL3 C-terminal de tipo silvestre o de la construcción diseñada. 5B ilustra los resultados de ANGPTL3 C-terminal (de tipo silvestre (WT)) o de las construcciones diseñadas 242KQ o 242Kdel o ANGPTL1 C-terminal.

La Figura 6 ilustra una representación esquemática del paradigma de dosificación (6A), seguida por una representación gráfica (6B) de la mejora en la gravedad de la articulación después del tratamiento con ANGPTL3 de ratón (17-460), como se mide mediante la puntuación de la erosión de cartílago del cóndilo femoral lateral.

La Figura 7 es una representación gráfica de las mediciones de incapacidad (un indicador del dolor) en los ratones después de la inducción quirúrgica de daño de cartílagos y el tratamiento subsiguiente con construcciones de ANGPTL3 una vez por semana durante tres semanas (empezando en el día 7). 7A representa las mediciones de incapacidad en el día 35 después de la cirugía; y 7B representa las mediciones tomadas en el día 56 después de la cirugía.

La Figura 8 es una representación gráfica de la puntuación total de gravedad de la articulación y de la mejora en la gravedad del daño de cartílagos inducida por colagenasa en los ratones después de 3 tratamientos una vez por semana (días 7, 14 y 21) de las construcciones de ANGPTL3 (indicadas).

La Figura 9 ilustra los resultados en un modelo de daño de articulación de desgarre de menisco de rata después del tratamiento con la construcción de ANGPTL3 diseñada. La Figura 9A es una representación gráfica del contenido de proteoglucano en las articulaciones cinco semanas después del tratamiento; la Figura 9B es una representación gráfica de la puntuación de la gravedad de la articulación femoral cinco semanas después del tratamiento. Los resultados ilustran la mejora al daño de cartílagos inducida por el corte quirúrgico del menisco en ratas después de 3 tratamientos una vez por semana (días 7, 14 y 21) de las construcciones de ANGPTL3 (indicadas).

La Figura 10 ilustra los resultados en un modelo de daño de articulación de desgarre de menisco de rata después del tratamiento con la construcción de ANGPTL3 diseñada. La Figura 10A es una representación gráfica del porcentaje de reparación *in vivo* medido por la gravedad, intensidad de safranina O, área del

cartílago, y espesor del cartílago. La Figura 10B es una representación gráfica de las mediciones de incapacidad (un indicador del dolor) en ratas después de la inducción quirúrgica de daño de cartílagos y el tratamiento subsiguiente.

La Figura 11 es una representación gráfica de la puntuación total de la gravedad general para ilustrar la mejora del daño de cartílagos inducida por la alteración quirúrgica del menisco medial en perros después de la dosificación bisemanal en el día 4 (cada una de 1.5 microgramos/dosis o de 15 microgramos/dosis), o una sola dosis de 30 microgramos dada en el día 7 solamente.

Descripción detallada

La presente invención se basa, cuando menos en parte, en la identificación de polipéptidos de angiopoietina tipo 3 (ANGPTL3) que estimulan la diferenciación de condrocitos de las células madre mesenquimales y que son resistentes a la disociación por las proteasas (por ejemplo, las proteasas tipo tripsina). La Publicación Internacional Número WO2011/008773, describe composiciones peptídicas de ANGPTL3 y el uso de las composiciones peptídicas para el tratamiento o la prevención de artritis y lesión de las articulaciones, y para inducir la diferenciación de las células mesenquimales hasta condrocitos. Encontramos que las proteínas de ANGPTL3 de tipo silvestre están sujetas a la sujeción de proteasa y a inestabilidad, y tienen variantes de secuencia identificadas para mitigar este efecto. La presente invención, por consiguiente, proporciona composiciones peptídicas mejoradas para la reparación del cartílago. En particular, se proporcionan péptidos de ANGPTL3 modificados de acuerdo con la presente invención, para tener una mayor resistencia a la proteasa comparándose con un polipéptido de ANGPTL3 de tipo silvestre. También se proporcionan composiciones y métodos para la administración de los polipéptidos de ANGPTL3 para prevenir o mitigar la artritis o lesión de las articulaciones, mediante la administración de un polipéptido de la invención en una articulación, un tejido de cartílago o un tejido proximal de cartílago, o sistémicamente. Además, la invención proporciona composiciones y métodos para la inducción de la diferenciación de células madre mesenquimales hasta condrocitos.

Definiciones

El término “resistente a la proteasa", como se utiliza en la presente, se refiere a un polipéptido que comprende una modificación que hace que el polipéptido sea menos susceptible a la disociación mediante una proteasa de tipo tripsina que un polipéptido de tipo silvestre no modificado correspondiente. En las realizaciones específicas un polipéptido resistente a la proteasa es un polipéptido de ANGPTL3 que tiene una sustitución de aminoácido, en relación con una secuencia peptídica de tipo silvestre nativa, en un residuo R o K.

“ANGPTL3” se refiere a un miembro de la familia de proteínas de angiopoietina. Una secuencia de aminoácidos de ANGPTL3 (GenBank Acceso Número NP_055310.1) se estipula en la SEQ ID NO: 1; y cuya secuencia de polinucleótidos correspondiente se estipula como la SEQ ID NO: 2 (NCBI número de la secuencia de referencia NM014495.2, en donde la secuencia de codificación de ANGPTL3 comprende los nucleótidos 52-1434 de la SEQ ID NO: 2). “Polipéptido de ANGPTL3” se refiere a un polipéptido expresado que se presenta naturalmente. Para los propósitos de la presente descripción, la numeración de un aminoácido es típicamente determinada con referencia a la secuencia de polipéptido de ANGPTL3 humana de tipo silvestre de longitud completa (SEQ ID NO: 1). Por consiguiente, en las realizaciones en donde un polipéptido de la invención contiene solamente una porción C-terminal de ANGPTL3 de longitud completa, pero no la porción N-terminal, aunque el péptido sea menor de 460 aminoácidos de longitud, la numeración de las posiciones se basa en la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, la referencia a la posición 423 de un polipéptido de ANGPTL3 de la invención se refiere a la posición 423 de la SEQ ID NO: 1, aun cuando el polipéptido de ANGPTL3 de la invención mismo pueda ser de solamente 200 aminoácidos de longitud. En la determinación de un aminoácido en una secuencia de interés que “corresponda a” una posición en una secuencia de referencia, tal como la SEQ ID NO: 1, esto se lleva a cabo mediante la alineación óptima de las secuencias, por ejemplo, utilizando los parámetros de alineación CLUSTAL por omisión o los parámetros de alineación BLAST 2 por omisión, y comparando las secuencias. Por ejemplo, la posición 423 en una secuencia de interés que es “determinada con referencia a la SEQ ID NO: 1”, o un aminoácido que “corresponde a” la posición 423 de la SEQ ID NO: 1, significa que el aminoácido que se alinea con la posición 423 de la SEQ ID NO: 1 cuando la secuencia de interés se alinea de una manera óptima con la SEQ ID NO: 1.

Los términos “peptidomimético" y "mimético” se refieren a un compuesto químico sintético que tiene características funcionales sustancialmente iguales a las de un polipéptido que se presente naturalmente o no naturalmente (por ejemplo, ANGPTL3), pero diferentes características estructurales (aunque típicamente similares). Los análogos de péptidos se utilizan comúnmente en el campo como compuestos activos no peptídicos (por ejemplo, fármacos) con propiedades análogas a aquéllas de un péptido de plantilla. Estos compuestos no peptídicos son denominados como "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos" (Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15: 29 (1986); Veber y Freidinger *TINS* página 392 (1985); y Evans et al., *J. Med. Chem.* 30: 1229 (1987)). Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles se pueden utilizar para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente o mejorado. En términos generales, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido de

paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica), tal como la que se encuentra en un polipéptido de interés, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado a partir del grupo que consiste en, por ejemplo, $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2-CH_2-$, -CH=CH- (cis y trans), $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$, y $-CH_2SO-$. Un mimético puede estar enteramente compuesto de análogos sintéticos no naturales de aminoácidos, o bien es una molécula quimérica de aminoácidos de péptidos parcialmente naturales y análogos de aminoácidos parcialmente no naturales. Un mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales, siempre que estas sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del mimético.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente, para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en donde uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido que se presente naturalmente correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos que se presentan naturalmente y a los polímeros de aminoácidos que no se presentan naturalmente. Los polipéptidos, péptidos, y las proteínas de la invención comprenden peptidomiméticos de ANGPTL3 resistentes a la proteasa, que tienen actividad condrogénica.

El término "aminoácido" se refiere a los aminoácidos de origen natural o sintéticos, así como a los análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se presentan naturalmente. Los aminoácidos que se presentan naturalmente son aquéllos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxi-prolina, γ-carboxi-glutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se presenta naturalmente, es decir, un carbono-α que se enlaza a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina-metil-sulfonio. Estos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras base de péptidos modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido que se presenta naturalmente. Los aminoácidos codificados naturalmente son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina), así como pirrolisina, pirrolina-carboxi-lisina, y selenocisteína.

"Variantes conservadoramente modificadas" se aplica a las secuencias tanto de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes conservadoramente modificadas se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, hasta secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por consiguiente, en cada posición en donde una alanina es especificada por un codón, el codón se puede alterar con cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", las cuales son una especie de variaciones conservadoramente modificadas. Cada secuencia de polipéptido en la presente, la cual es codificada por un polinucleótido, abarca cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, el cual es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, el cual es ordinariamente el único codón para triptófano) se puede modificar para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica. De conformidad con lo anterior, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Un experto reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido, o proteína, que alteren, agreguen o supriman un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos con referencia a una secuencia de aminoácidos codificada original, dan como resultado una "variante conservadoramente modificada", en donde la alteración produce la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar y/o con una secuencia de polipéptido que produce una proteína estructuralmente similar que tiene una actividad funcional similar a aquélla de la proteína original. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en este campo. Estas variantes conservadoramente modificadas son en adición a, y no excluyen, las variantes polimórficas, los homólogos entre especies, y los alelos de la invención.

El término “sustituciones de aminoácidos conservadoras” se refiere a la sustitución (conceptualmente o de otra manera) de un aminoácido a partir de un grupo con un aminoácido diferente a partir del mismo grupo. Un ejemplo de sustituciones se basa en el análisis de las frecuencias normalizadas de cambios de aminoácidos entre las proteínas correspondientes de organismos homólogos (véase, por ejemplo, Schulz, G. E. y R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). De acuerdo con este análisis, se pueden definir grupos de aminoácidos en donde los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian preferencialmente unos con otros y, por consiguiente, se parecen unos a otros más en su impacto sobre la estructura global de la proteína (véase, por ejemplo, Schulz, G. E. y R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag).

Un ejemplo de un conjunto de grupos de aminoácidos definidos de esta manera incluye: (i) un grupo cargado, que consiste en Glu y Asp, Lys, Arg y His; (ii) un grupo positivamente cargado, que consiste en Lys, Arg y His; (iii) un grupo negativamente cargado, que consiste en Glu y Asp; (iv) un grupo aromático, que consiste en Phe, Tyr y Trp; (v) un grupo de anillo de nitrógeno, que consiste en His y Trp; (vi) un grupo no polar alifático grande, que consiste en Val, Leu e Ile; (vii) un grupo ligeramente polar, que consiste en Met y Cys; (viii) un grupo de residuo pequeño, que consiste en Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln y Pro; (ix) un grupo alifático que consiste en Val, Leu, Ile, Met y Cys; y (x) un grupo hidroxilo pequeño, que consiste en Ser y Thr. Otros ejemplos de sustituciones conservadoras basadas en las propiedades físicas compartidas son las sustituciones dentro de los siguientes grupos :1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)).

El “Porcentaje de identidad de secuencia” se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de aminoácidos o de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) comparándose con la secuencia de referencia (por ejemplo, un polipéptido de la invención), que no comprenda adiciones o supresiones, para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante la determinación del número de posiciones en donde se presenta la base de ácido nucleico idéntica o el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones emparejadas, se divide el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación, y se multiplica el resultado por 100, para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos “idéntica” o porcentaje de “identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma secuencia. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, el 95 % de identidad, opcionalmente el 96 %, el 97 %, el 98 %, o el 99 % de identidad sobre una región especificada, o, cuando no se especifica, sobre la secuencia entera), cuando se comparan y se alinean para una máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o sobre una región designada como se mide utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias, o mediante alineación manual e inspección visual. La invención proporciona polipéptidos que son sustancialmente idénticos a los polipéptidos, respectivamente, ejemplificados en la presente (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOs: 11-42), así como los usos de los mismos, incluyendo, pero no limitándose a, el uso para el tratamiento o la prevención de artritis o lesión de las articulaciones. Opcionalmente, para los ácidos nucleicos, la identidad existe sobre una región que es de cuando menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, o más preferiblemente sobre una región que es de 300 a 450 o 600 o más nucleótidos de longitud, o sobre toda la longitud de la secuencia de referencia. Para la secuencia de aminoácidos, opcionalmente, existe identidad sobre una región que es de cuando menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o más preferiblemente sobre una región que es de 100 a 150 o 200 o más aminoácidos de longitud, o sobre toda la longitud de la secuencia de referencia.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen las secuencias de prueba y de referencia en una computadora, se designan las coordenadas de las subsecuencias, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Se pueden utilizar los parámetros del programa por omisión, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se utiliza en la presente, incluye la referencia a un segmento de cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas a partir del grupo que consiste en de 50 a 600, usualmente de aproximadamente 75 a aproximadamente 200, más usualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en donde se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que se alinean óptimamente las dos secuencias. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en este campo. La alineación óptima de las secuencias para comparación se puede conducir, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2: 482c, mediante el algoritmo de alineación de homologías de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443, mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat’l. Acad. Sci. EUA* 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 suplemento)).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y de similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAS 2.0, los cuales se describen en Altschul et al. (1977) *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402, y Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. El

software para llevar a cabo los análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo involucra identificar primero los pares de secuencias de alto puntaje (HSPs), mediante la identificación de las palabras cortas de longitud W en la secuencia pedida, las cuales concuerdan o satisfacen algún puntaje umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T es referido como el umbral de puntaje de palabra vecina (Altschul et al., *supra*). Estos impactos de palabra vecina iniciales actúan como siembras para iniciar las búsquedas con el fin de encontrar pares de secuencias de alto puntaje más largos que las contengan. Los impactos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia por tanto como se pueda aumentar el puntaje de alineación acumulativo. Los puntajes acumulativos se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos emparejados; siempre >0), y N (puntaje de multa para los residuos mal emparejados; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntaje para calcular el puntaje acumulativo. La extensión de los impactos de palabras en cada dirección se detiene cuando: el puntaje de alineación acumulativo cae fuera por la cantidad X desde su máximo valor alcanzado; el puntaje acumulativo llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntaje negativo; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W, T, y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como omisión una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por omisión una longitud de palabra de 3, y una expectativa (C) de 10, y la matriz de puntaje BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 89: 10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90: 5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se presentaría un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos por azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0.2, más preferiblemente menor de aproximadamente 0.01, y de una manera muy preferible menor de aproximadamente 0.001.

El término “aislado", cuando se aplica a un ácido nucleico o a una proteína, denota que el ácido nucleico o la proteína se purifica para quedar esencialmente libre de otros componentes celulares con los cuales esté asociada en el estado natural. Con frecuencia está en un estado homogéneo o casi homogéneo. Puede estar en una solución ya sea seca o bien acuosa. La pureza y la homogeneidad se pueden determinar empleando las técnicas químicas analíticas conocidas y utilizadas típicamente en la materia, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía de líquidos de alto rendimiento, etc. Una proteína que sea la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. El término “purificada” en algunas realizaciones denota que una proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético. Típicamente, significa que una proteína es cuando menos el 85 % pura, más preferiblemente cuando menos el 95 % pura, y de una manera muy preferible cuando menos el 99 % pura.

El término "ácido hialurónico" se utiliza en la presente para incluir derivados de ácido hialurónico que incluyen ésteres de ácido hialurónico, sales de ácido hialurónico, y también incluye el término hialuronano. La designación también incluye las formas de hialuronanos tanto de bajo como de alto peso molecular y los hialuronanos reticulados, o hilanos. Los ejemplos de estos hialuronanos son Synvisc^{MR} (Genzyme Corp. Cambridge, Mass.), ORTHOVISC^{MR} (Anika Therapeutics, Woburn, Mass.), HYALGAN^{MR} (Sanofi-Synthelabo Inc., Malvern, Pa.), y ProVisc (Alcon/Novartis).

Como se utilizan en esta memoria descriptiva, y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", y "el", “la” incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera.

Polipéptidos de angiopoietina tipo 3 resistentes a la proteasa

La angiopoietina tipo 3 es un miembro de la familia de factores secretados de tipo angiopoietina. Se expresa predominantemente en el hígado, y tiene la estructura característica de las angiopoietinas, que consiste en un péptido de señal, un dominio enrollado en espiral N-terminal (CCD), y el dominio tipo fibrinógeno (FBN) C-terminal. Se demostró que la angiopoietina tipo 3 se enlaza a las integrinas αV/ß3, y el dominio tipo FBN solo fue suficiente para inducir la adhesión celular endotelial y en la angiogénesis *in vivo* (Camenisch et al., *J. Biol. Chem.* 277: 17281-17290, 2002). La ANGPTL3 endógena se disocia en general *in vivo* en los fragmentos amino-terminal y carboxi-terminal. Como se resume anteriormente y como se describe adicionalmente en la presente, la presente invención contempla el uso de diversas proteínas de ANGPTL3 resistentes a la proteasa que tienen actividad condrogénica.

En algunas realizaciones, un polipéptido aislado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene cuando menos el 95 % de identidadcon una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de una cualquiera de las secuencias de la Tabla 1, en donde el polipéptido comprende un aminoácido que es un aminoácido polar diferente de K o R en la posición 423 o el polipéptido comprende una supresión en la posición 423, como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1. Los polipéptidos de la invención tienen actividad condrogénica. En algunas realizaciones, un polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que tiene cuando menos el 95 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de una cualquiera de las SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70, en donde el polipéptido comprende un aminoácido que es un aminoácido polar diferente de K o R en la posición 423 o el polipéptido comprende una supresión en la posición 423, como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1, y el polipéptido tiene actividad condrogénica. En una realización adicional, un polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos que tiene cuando menos el 95 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de una cualquiera de las SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, o SEQ ID NO: 64, en donde el polipéptido comprende un aminoácido que es un aminoácido polar diferente de K o R en la posición 423, como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1, y el polipéptido tiene actividad condrogénica.

En algunas realizaciones, un polipéptido aislado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de una cualquiera de las secuencias de la Tabla 1, en donde el polipéptido comprende un aminoácido que es un aminoácido polar diferente de K o R en la posición 423 o el polipéptido comprende una supresión en la posición 423, como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1, y el polipéptido tiene actividad condrogénica. En algunas realizaciones, un polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de una cualquiera de las SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70, en donde el polipéptido comprende un aminoácido que es un aminoácido polar diferente de K o R en la posición 423 o el polipéptido comprende una supresión en la posición 423, como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1, y el polipéptido tiene actividad condrogénica. En una realización adicional, un polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de una cualquiera de las SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, o SEQ ID NO: 64, en donde el polipéptido comprende un aminoácido que es un aminoácido polar diferente de K o R en la posición 423, como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1, y el polipéptido tiene actividad condrogénica.

En algunas realizaciones, un polipéptido aislado tiene cuando menos el 95 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de una cualquiera de las secuencias de la Tabla 1, en donde el polipéptido comprende un aminoácido que es un aminoácido polar diferente de K o R en la posición 423 o el polipéptido comprende una supresión en la posición 423, como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1, y el polipéptido tiene actividad condrogénica. En algunas realizaciones, un polipéptido tiene cuando menos el 95 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de una cualquiera de las SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70, en donde el polipéptido comprende un aminoácido que es un aminoácido polar diferente de K o R en la posición 423 o el polipéptido comprende una supresión en la posición 423, como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1, y el polipéptido tiene actividad condrogénica. En una realización adicional, un polipéptido tiene cuando menos el 95 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de una cualquiera de las SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, o SEQ ID NO: 64, en donde el polipéptido comprende un aminoácido que es un aminoácido polar diferente de K o R en la posición 423, como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1, y el polipéptido tiene actividad condrogénica.

En algunas realizaciones, un polipéptido aislado es una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de una cualquiera de las secuencias de la Tabla 1. En algunas realizaciones, un polipéptido es una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de una cualquiera de las SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70. En una realización adicional, un polipéptido es una secuencia de

aminoácidos seleccionada a partir de una cualquiera de las SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, o SEQ ID NO: 64.

Tabla 1: Construcciones de variantes de ANGPTL3

SEQ ID	**Construcción**	**Secuencia**
14	**207KQ**	IQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNR GEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDW KDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRA QSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
15	**207KS**	IQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNR GEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDW KDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRA SSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
16	**225KQ**	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQ VFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNH ETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKS QNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
17	**225KS**	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQ VFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNH ETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQ NGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
18	**225ST**	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQ VFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNH ETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKTKPERRRGLSWKSQ NGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
19	**226KQ**	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQV FHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDG EFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHE TNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGY SGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQ NGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE

SEQ ID	Construcción	Secuencia
20	226KS	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQV FHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDG EFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHE TNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGY SGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQN GRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
21	228KQ	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFH VYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEF WLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETN YTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSG GWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNG RLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
22	228KS	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFH VYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEF WLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETN YTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSG GWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNG RLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
23	228ST	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFH VYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEF WLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETN YTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSG GWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKTKPERRRGLSWKSQNGR LYSIKSTKMLIHPTDSESFE
24	233KQ	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDV ISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLE KIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLV AITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWW HDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESFE
25	233KS	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDV ISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLE KIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLV AITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWW HDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKS TKMLIHPTDSESFE
26	241KQ	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTL IQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQS NYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPN AIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGEN NLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPT DSESFE

SEQ ID	Construcción	Secuencia
27	241KS	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTL IQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQS NYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPN AIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGEN NLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPT DSESFE
28	242KQ	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLI QHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSN YVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAI PENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNL NGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD SESFE
29	242KS	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLI QHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSN YVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAI PENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNL NGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDS ESFE
30	225-455KQ	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQ VFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNH ETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKS QNGRLYSIKSTKMLIHPTD
31	225-455KS	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQ VFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNH ETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQ NGRLYSIKSTKMLIHPTD
32	226-455KQ	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQV FHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDG EFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHE TNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGY SGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQ NGRLYSIKSTKMLIHPTD
33	226-455KS	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQV FHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDG EFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHE TNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGY SGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQN GRLYSIKSTKMLIHPTD

SEQ ID	Construcción	Secuencia
34	228-455KQ	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
35	228-455KS	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
36	233-455KQ	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
37	233-455KS	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
38	241-455KQ	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
39	241-455KS	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
40	242-455KQ	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
41	242-455KS	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

SEQ ID	Construcción	Secuencia
58	207Kdel	IQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNR GEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDW KDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRA SKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
59	225Kdel	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQ VFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNH ETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQN GRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
60	226Kdel	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQV FHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDG EFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHE TNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGY SGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQN GRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
61	228Kdel	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFH VYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEF WLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETN YTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSG GWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRL YSIKSTKMLIHPTDSESFE
62	233Kdel	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDV ISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLE KIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLV AITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWW HDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKST KMLIHPTDSESFE
63	241Kdel	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTL IQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQS NYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPN AIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGEN NLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD SESFE
64	242Kdel	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLI QHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSN YVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAI PENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNL NGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSE SFE

SEQ ID	Construcción	Secuencia
65	225-455Kdel	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQ VFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNH ETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQN GRLYSIKSTKMLIHPTD
66	226-455Kdel	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQV FHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDG EFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHE TNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGY SGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQN GRLYSIKSTKMLIHPTD
67	228-455Kdel	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFH VYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEF WLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETN YTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSG GWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRL YSIKSTKMLIHPTD
68	233-455Kdel	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDV ISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLE KIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLV AITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWW HDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKST KMLIHPTD
69	241-455Kdel	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTL IQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQS NYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPN AIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGEN NLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
70	242-455Kdel	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLI QHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSN YVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAI PENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNL NGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

Los polipéptidos de ANGPTL3 modificados de la invención tienen cuando menos una sustitución en la porción C-terminal del polipéptido para hacer que el polipéptido sea resistente a la proteasa. La sustitución está en un residuo R o K, de tal manera que los polipéptidos tengan una mayor resistencia, por ejemplo, a las proteasas tipo tripsina. Cualquier aminoácido puede ser sustituido por un R o K en un polipéptido de ANGPTL3 resistente a la proteasa de la invención. En algunas realizaciones, una sustitución es un aminoácido polar, por ejemplo, H, N, Q, S, T, A, o Y. En algunas realizaciones, una sustitución es H, N, Q, S, T, o Y. En algunas realizaciones, una sustitución es S o Q. En algunas realizaciones, la sustitución es Q. En algunas realizaciones, la sustitución es S. En algunas realizaciones, un péptido resistente a la proteasa tiene un aminoácido en la posición 423, con referencia a la SEQ ID NO: 1, que es diferente de K o R. En algunas realizaciones, un polipéptido de la invención comprende un aminoácido en la posición 423 que es un aminoácido polar. Por ejemplo, el aminoácido en la posición 423 puede ser Q o S u otro aminoácido polar. En

ciertas realizaciones, un polipéptido de la invención tiene un Q en la posición 423. En otras realizaciones, un polipéptido de la invención tiene un S en la posición 423. En algunas realizaciones, en adición a la sustitución en 423, el péptido resistente a la proteasa tiene una sustitución de otro R o K en el término C de la SEQ ID NO: 1, o una variante de la misma, en donde la sustitución es un aminoácido polar diferente de R o K. En algunas realizaciones, la sustitución en la posición 423 como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1, es Q o S. En todavía otras realizaciones, un polipéptido de la invención tiene una supresión en la posición 423 como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, un polipéptido de la invención es de 250 aminoácidos o menos de longitud, y comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70.

En algunas realizaciones, la invención proporciona el uso de proteínas de ANGPTL3 condrogénicas de longitud completa resistentes a la proteasa. En algunas realizaciones, la invención proporciona proteínas de ANGPTL3 resistentes a la proteasa, las cuales comprenden una porción C-terminal de la secuencia de ANGPTL3, o una variante condrogénica de la misma. En ciertas realizaciones, las proteínas de ANGPTL3 carecen del extremo amino-terminal de la proteína nativa. En algunas realizaciones, las proteínas de ANGPTL3 resistentes a la proteasa de la invención carecen del dominio CCD y/o carecen de una actividad de CCD significativa. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las proteínas de ANGPTL3 resistentes a la proteasa de la invención comprenden cuando menos un fragmento (por ejemplo, cuando menos 100, 150, 200, 220 o 215 aminoácidos contiguos) de un dominio carboxi-terminal de la proteína de ANGPTL3 humana, o una secuencia sustancialmente idéntica a la secuencia de proteína de ANGPTL3 carboxi-terminal humana, en donde el polipéptido y las variantes del mismo conservan la actividad condrogénica. En algunas realizaciones, un polipéptido resistente a la proteasa de la invención carece de cuando menos una porción de la secuencia C-terminal, por ejemplo, carece de 5, 10, 15, o 20 aminoácidos del extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 1 (es decir, carece de los 456-460, 451-460, 446-460 o 441-460 de la SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones, un polipéptido de ANGPTL3 resistente a la proteasa de la invención comprende los aminoácidos contiguos correspondientes a las regiones de aminoácidos: aminoácidos 241-455, o 241-460 de la SEQ ID NO: 1; aminoácidos 242-455, o 242-460 de la SEQ ID NO: 1; aminoácidos 233-455 o 233-460 de la SEQ ID NO: 1; aminoácidos 228-455 o 228-460 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 226-455 o 226-260 o los aminoácidos 225-455 o 225-260 de la SEQ ID NO: 1, en donde un aminoácido es sustituido por un R o K, o se suprime un solo residuo. En algunas realizaciones, una sustitución está en la posición 423 como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una supresión está en la posición 423 como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, un polipéptido resistente a la proteasa comprende los aminoácidos contiguos correspondientes a las regiones de aminoácidos 207-455 o 207-460 de la SEQ ID NO: 1, en donde un aminoácido es sustituido por R o K, o se suprime un solo residuo. En algunas realizaciones, una sustitución o supresión está en la posición 423. En algunas realizaciones, una sustitución es un aminoácido polar, por ejemplo, H, N, Q, S, T, A, o Y. En algunas realizaciones, una sustitución es H, N, Q, S, T, o Y. En algunas realizaciones, una sustitución es S o Q. En algunas realizaciones, una sustitución es Q. En ciertas realizaciones, se incluye una supresión en la posición 423 en relación con la SEQ ID NO: 1.

La invención adicionalmente proporciona un polipéptido resistente a la proteasa, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene cuando menos el 95 % de identidad con los aminoácidos 240-454 de la SEQ ID NO: 1, con los aminoácidos 241-455 de la SEQ ID NO: 1, o con los aminoácidos 242-455 de la SEQ ID NO: 1 con una sustitución o supresión en el aminoácido correspondiente a la posición 423 de la SEQ ID NO: 1, en donde el aminoácido sustituido no es R, y en donde el polipéptido tiene actividad condrogénica. En otras realizaciones, el polipéptido comprende los aminoácidos 240-454 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 241-455 de la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 242-455 de la SEQ ID NO: 1, cada polipéptido con una sustitución o supresión en el aminoácido correspondiente a la posición 423 de la SEQ ID NO: 1, en donde el aminoácido sustituido es Q o S.

En algunas realizaciones, un polipéptido de ANGPTL3 resistente a la proteasa de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene cuando menos el 95 % con los aminoácidos 242-455 o 242-460 de la SEQ ID NO: 1; 241-455 o 241-460 de la SEQ ID NO: 1; con los aminoácidos 233-455 o 233-460 de la SEQ ID NO: 1; con los aminoácidos 228-455 o 228-460 de la SEQ ID NO: 1, con los aminoácidos 226-455 o 226-260 de la SEQ ID NO: 1, o con los aminoácidos 225-455 o 225-260 de la SEQ ID NO: 1, en donde un aminoácido es sustituido por un R o K, o un R o K es suprimido. En algunas realizaciones, la sustitución o supresión está en la posición 423. En algunas realizaciones, una sustitución es un aminoácido polar, por ejemplo, H, N, Q, S, T, A, o Y. En algunas realizaciones, una sustitución es H, N, Q, S, T, o Y. En algunas realizaciones, la sustitución es S o Q. En algunas realizaciones, la sustitución es un Q. En ciertas realizaciones hay un residuo suprimido en la posición 423 en relación con la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, un polipéptido de ANGPTL3 resistente a la proteasa de la invención es de 250 o 240 o menos aminoácidos de longitud y comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, y SEQ ID NO: 70. En algunas realizaciones, un polipéptido de ANGPTL3 resistente a la proteasa de la invención es de 230 o 225 o menos aminoácidos de longitud y comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, o SEQ ID NO: 70.

Se divulgan adicionalmente proteínas de ANGPTL3 resistentes a la proteasa de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene cuando menos el 95 % de identidad, o cuando menos el 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, con la secuencia de proteína de ANGPTL3 C-terminal canina, bovina o equina. En algunos aspectos de la divulgación, las proteínas de ANGPTL3 resistentes a la proteasa de la divulgación comprenden cuando menos un fragmento (por ejemplo, cuando menos 100, 150, 200, 215 aminoácidos contiguos) de una secuencia de proteína de ANGPTL3 canina (SEQ ID NO: 4), equina (SEQ ID NO: 5), o bovina (SEQ ID NO: 6) nativa, o una secuencia sustancialmente idéntica a la secuencia de proteína de ANGPTL3 canina, bovina, o equina nativa en donde el polipéptido comprende un aminoácido que es un aminoácido polar diferente de K o R en la posición 423 o el polipéptido comprende una supresión en la posición 423, como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1, y el polipéptido tiene actividad condrogénica. En algunos aspectos de la divulgación, un polipéptido aislado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene cuando menos el 95 % de identidad, o cuando menos el 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, con la SEQ ID NO: 42 o con la SEQ ID NO: 43, en donde el polipéptido comprende un aminoácido que es un aminoácido polar diferente de K o R en la posición 423 o el polipéptido comprende una supresión en la posición 423, como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1, y el polipéptido tiene actividad condrogénica. En algunas realizaciones, un polipéptido tiene cuando menos el 95 % de identidad, o cuando menos el 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, con la SEQ ID NO: 42 o con la SEQ ID NO: 43, en donde el polipéptido comprende un aminoácido que es un aminoácido polar diferente de K o R en la posición 423 o el polipéptido comprende una supresión en la posición 423, como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1, y el polipéptido tiene actividad condrogénica. En ciertos aspectos de la divulgación, un polipéptido comprende la SEQ ID NO: 42 o la SEQ ID NO: 43. En un aspecto adicional de la divulgación, un polipéptido es la SEQ ID NO: 42, o la SEQ ID NO: 43.

En algunos aspectos de la divulgación, una ANGPTL3 resistente a la proteasa de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene cuando menos el 95 %, o cuando menos el 96 %, 97 %, 98 %, o cuando menos el 99 % de identidad con los aminoácidos 232-454 de la SEQ ID NO: 4, con los aminoácidos 240-454 de la SEQ ID NO: 4, con los aminoácidos 227-454 de la SEQ ID NO: 4, o con los aminoácidos 224-454 de la SEQ ID NO: 4, en donde un aminoácido es sustituido por un R o K, o hay una supresión de un R o K. En algunas realizaciones, la sustitución o supresión está en la posición 422 de la SEQ ID NO: 4, que corresponde a la posición 423 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una sustitución es un aminoácido polar, por ejemplo, H, N, Q, S, T, A, o Y. En algunas realizaciones, una sustitución es H, N, Q, S, T, o Y. En algunas realizaciones, la sustitución es S o Q. En algunas realizaciones, la sustitución es un Q. En algunas realizaciones, una supresión de aminoácido está en la posición 422 de la SEQ ID NO: 4.

En algunos aspectos de la divulgación, una ANGPTL3 resistente a la proteasa de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene cuando menos el 95 %, o cuando menos el 96 %, 97 %, 98 %, o cuando menos el 99 % de identidad con los aminoácidos 233-455 de la SEQ ID NO: 5, con los aminoácidos 241-455 de la SEQ ID NO: 5, con los aminoácidos 228-455 de la SEQ ID NO: 5, o con los aminoácidos 225-455 de la SEQ ID NO: 5, en donde un aminoácido es sustituido por un R o K, o hay una supresión de un R o K. En algunos aspectos de la divulgación, la sustitución o supresión está en la posición 423 de la SEQ ID NO: 5, que corresponde a la posición 423 de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos de la divulgación, una sustitución es un aminoácido polar, por ejemplo, H, N, Q, S, T, A, o Y. En algunas realizaciones, una sustitución es H, N, Q, S, T, o Y. En algunos aspectos de la divulgación, la sustitución es S o Q. En algunas realizaciones, la sustitución es un Q. En algunos aspectos de la divulgación, una supresión de aminoácido está en la posición 423 de la SEQ ID NO: 5.

En algunos aspectos de la divulgación, una ANGPTL3 resistente a la proteasa de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene cuando menos el 95 %, o cuando menos el 96 %, 97 %, 98 %, o cuando menos el 99 % de identidad con los aminoácidos 233-455 de la SEQ ID NO: 6, con los aminoácidos 241-455 de la SEQ ID NO: 6, con los aminoácidos 228-455 de la SEQ ID NO: 6, o con los aminoácidos 225-455 de la SEQ ID NO: 6, en donde un aminoácido es sustituido por un R o K, o hay una supresión de un R o K. En algunos aspectos de la divulgación, la sustitución o supresión está en la posición 422 de la SEQ ID NO: 6, que corresponde a la posición 423 de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos de la divulgación, una sustitución es un aminoácido polar, por ejemplo, H, N, Q, S, T, A, o Y. En algunos aspectos de la divulgación, una

sustitución es H, N, Q, S, T, o Y. En algunos aspectos de la divulgación, la sustitución es S o Q. En algunas realizaciones, la sustitución es un Q. En algunos aspectos de la divulgación, una supresión de aminoácido está en la posición 422 de la SEQ ID NO: 6.

En algunos aspectos de la divulgación, un polipéptido de ANGPTL3 resistente a la proteasa de la invención comprende los aminoácidos contiguos correspondientes a las regiones de aminoácidos: aminoácidos 240-454 de la SEQ ID NO: 4; aminoácidos 232-454 de la SEQ ID NO: 4; aminoácidos 227-454 de la SEQ ID NO: 4, o los aminoácidos 224-454 de la SEQ ID NO: 4, en donde un aminoácido es sustituido por un R o K, o hay una supresión de un R o K. En algunos aspectos de la divulgación, la sustitución o supresión está en la posición 422 de la SEQ ID NO: 4 (la cual es la posición 423 como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1). En algunos aspectos de la divulgación, una sustitución es un aminoácido polar, por ejemplo, H, N, Q, S, T, A, o Y. En algunas realizaciones, una sustitución es H, N, Q, S, T, o Y. En algunos aspectos de la divulgación, la sustitución es S o Q. En algunos aspectos de la divulgación, la sustitución es Q. En algunas realizaciones, una supresión de aminoácido está en la posición 422 de la SEQ ID NO: 4.

En algunos aspectos de la divulgación, un polipéptido de ANGPTL3 resistente a la proteasa de la invención comprende los aminoácidos contiguos correspondientes a las regiones de aminoácidos: aminoácidos 241-455 de la SEQ ID NO: 5; aminoácidos 233-455 de la SEQ ID NO: 5; aminoácidos 228-455 de la SEQ ID NO: 5, o los aminoácidos 225-455 de la SEQ ID NO: 5, en donde un aminoácido es sustituido por un R o K, o hay una supresión de un R o K. En algunos aspectos de la divulgación, la sustitución o supresión está en la posición 423 (la cual corresponde a la posición 423 como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1). En algunos aspectos de la divulgación, una sustitución es un aminoácido polar, por ejemplo, H, N, Q, S, T, A, o Y. En algunas realizaciones, una sustitución es H, N, Q, S, T, o Y. En algunos aspectos de la divulgación, la sustitución es S o Q. En algunos aspectos, la sustitución es Q. En algunos aspectos de la divulgación, una supresión de aminoácido está en la posición 423 de la SEQ ID NO: 5.

En algunos aspectos de la divulgación, un polipéptido de ANGPTL3 resistente a la proteasa de la invención comprende los aminoácidos contiguos correspondientes a las regiones de aminoácidos: aminoácidos 241-455 de la SEQ ID NO: 6; aminoácidos 233-455 de la SEQ ID NO: 6; aminoácidos 228-455 de la SEQ ID NO: 6, o los aminoácidos 225-455 de la SEQ ID NO: 6, en donde un aminoácido es sustituido por un R o K, o hay una supresión de un R o K. En algunos aspectos de la divulgación, la sustitución o supresión está en la posición 422 de la SEQ ID NO: 6 (la cual es la posición 423 como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1). En algunos aspectos de la divulgación, una sustitución es un aminoácido polar, por ejemplo, H, N, Q, S, T, A, o Y. En algunos aspectos de la divulgación, una sustitución es H, N, Q, S, T, o Y. En algunos aspectos de la divulgación, la sustitución es S o Q. En algunas realizaciones, la sustitución es Q. En algunas realizaciones hay una supresión en la posición 422 de la SEQ ID NO: 6.

Las proteínas de ANGPTL3 de la invención, como se describe anteriormente, pueden incluir secuencias de proteínas de ANGPTL3 nativas flanqueando las regiones descritas anteriormente. De una manera alternativa, en algunas realizaciones, las proteínas de ANGPTL3 de la invención pueden incluir secuencias de flanqueo de la proteína de ANGPTL3 no nativas. Por ejemplo, la porción con actividad condrogénica de una proteína de ANGPTL3 se puede fusionar con uno o más componentes de fusión y/o aminoácidos heterólogos para formar una proteína de fusión. Las secuencias componentes de fusión pueden incluir, pero no se limitan a, marcas de aminoácidos, aminoácidos que no sean L- (por ejemplo, D-), u otros miméticos de aminoácidos para extender la vida media *in vivo* y/o la resistencia a la proteasa, secuencias de dirección, u otras secuencias.

En algunas realizaciones, un polipéptido de la invención está PEGilado. En algunas realizaciones, un polipéptido de la invención se fusiona con un péptido heterólogo. En ciertas realizaciones, un polipéptido se fusiona con cualquiera de albúmina de suero humano (HSA), una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), una polihistidina, una glutationa-S-transferasa (GST), una tiorredoxina, una proteína A, una proteína G, una proteína de enlace a maltosa (MBP), o un fragmento de cualquiera de los polipéptidos heterólogos anteriores. En las realizaciones particulares, un polipéptido heterólogo se fusiona en el extremo amino-terminal del polipéptido de la invención. En las realizaciones adicionales o alternativas, un polipéptido heterólogo se fusiona en el extremo carboxi-terminal del polipéptido de la invención.

Las proteínas de **[0001]** ANGPTL3 de la invención tienen actividad condrogénica y son resistentes a la proteasa. Como se define en la presente, condrogénesis o actividad condrogénica se refiere al desarrollo de condrocitos a partir de células madre mesenquimales (MSCs). Los indicadores de la actividad condrogénica incluyen, pero no se limitan a, la producción de matriz de cartílago. La producción de matriz de cartílago se puede medir mediante diversos marcadores, por ejemplo, tales como Sox9, colágeno tipo II, o la producción de glucosaminoglucano (GAG). En algunas realizaciones, la producción de glucosaminoglucano (GAG) se mide como un marcador para la producción de matriz de cartílago. En algunas realizaciones, un aumento de 3 veces en la producción de glucosaminoglucano (GAG) con expresión de proteína específica de cartílago indica la producción positiva de matriz de cartílago.

Un polipéptido se puede evaluar para determinar su resistencia a la proteasa utilizando cualquier ensayo conocido que mida la disociación mediante una proteasa de serina, tal como tripsina. En algunas

realizaciones, la proteasa empleada para evaluar la susceptibilidad a la proteólisis es la proteasa de serina tripsina. Un polipéptido se considera que es resistente a la proteasa si ha reducido su sensibilidad a la tripsina cuando se compara con su contraparte de tipo silvestre. Un ejemplo de un ensayo es medir la cantidad de producto disociado que se genera cuando un polipéptido se expone a la tripsina durante un período de tiempo en comparación con un péptido humano nativo correspondiente. La disociación se puede medir utilizando cualquier ensayo conocido, por ejemplo, SDS-PAGE o LCMS. Un ensayo ilustrativo se proporciona en la sección de Ejemplos.

En un ensayo ilustrativo, se lleva a cabo una proteólisis limitada mediante tripsinólisis mediante la incubación de 10 nanogramos de la proteína que se vaya a evaluar con tripsina en una proporción de masa de 8000:1 (Proteína:Tripsina) durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción de tripsinólisis entonces se puede apagar mediante la adición de ácido acético para llevar la reacción hasta un pH de 3.0. Las muestras apagadas entonces se separan, se analizan mediante SDS-PAGE, por ejemplo, sobre un gel del 4 al 12 % de Tris-Bis, para identificar las proteínas que sean resistentes a la disociación a partir de aquéllas que sean disociadas mediante la aparición de un fragmento que sea generado por la disociación con tripsina. El producto de la disociación está ausente o se reduce en los polipéptidos resistentes a la proteasa en comparación con sus contrapartes de tipo silvestre.

En algunos aspectos de la divulgación, los polipéptidos de ANGPTL3 de la invención comprenderán cuando menos un aminoácido que no sea codificado naturalmente. En algunos aspectos de la divulgación, un polipéptido comprende 1, 2, 3, 4, o más aminoácidos no naturales. Los métodos para la elaboración e introducción de un aminoácido que no se presente naturalmente en una proteína son conocidos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 7,083,970 y 7,524,647. Los principios generales para la producción de los sistemas de traducción ortogonal que son adecuados para hacer proteínas que comprendan uno o más aminoácidos no naturales deseados, son conocidos en la materia, así como los métodos generales para la producción de los sistemas de traducción ortogonal. Por ejemplo, véanse Las Publicaciones Internacionales Números WO 2002/086075, titulada "METHODS AND COMPOSITION FOR THE PRODUCTION OF ORTHOGONAL tRNA-AMINOACYL-tRNA SYNTHETASE PAIRS"; WO 2002/085923, titulada "IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS"; WO 2004/094593, titulada "EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE"; WO 2005/019415, presentada el 7 de julio de 2004; WO 2005/007870, presentada el 7 de julio de 2004; WO 2005/007624, presentada el 7 de julio de 2004; WO 2006/110182, presentada el 27 de octubre de 2005, titulada "ORTHOGONAL TRANSLATION COMPONENTS FOR THE IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS", y WO 2007/103490, presentada el 7 de marzo de 2007, titulada "SYSTEMS FOR THE EXPRESSION OF ORTHOGONAL TRANSLATION COMPONENTS IN EUBACTERIAL HOST CELLS". Para una discusión de los sistemas de traducción ortogonal que incorporan aminoácidos no naturales, y los métodos para su producción y uso, véanse también, Wang y Schultz (2005) "Expanding the Genetic Code". Angewandte Chemie Int Ed 44: 34-66; Xie y Schultz (2005) "An Expanding Genetic Code". Methods 36: 227-238; Xie y Schultz (2005) "Adding Amino Acids to the Genetic Repertoire". Curr Opinion in Chemical Biology 9: 548-554; y Wang et al. (2006) "Expanding the Genetic Code". Annu Rev Biophys Biomol Struct 35: 225-249; Deiters et al. (2005) "In vivo incorporation of an alkyne into proteins in Escherichia coli". Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 15: 1521-1524; Chin et al. (2002) "Addition of p-Azido-L-phenylalanine to the Genetic Code of Escherichia coli". J Am Chem Soc 124: 9026-9027; y la Publicación Internacional Número WO2006/034332, presentada el 20 de septiembre de 2005. Los detalles adicionales se encuentran en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 7,045,337; 7,083,970; 7,238,510; 7,129,333; 7,262,040; 7,183,082; 7,199,222; y 7,217,809.

Un "aminoácido que no es codificado naturalmente" se refiere a un aminoácido que no es uno de los aminoácidos comunes o pirrolisina, pirrolina-carboxi-lisina, o selenocisteína. Otros términos que se puede utilizar de una forma sinónima con el término "aminoácido que no es codificado naturalmente" son "aminoácido no natural", "aminoácido innatural", "aminoácido que no se presenta naturalmente", y diferentes versiones con guiones y sin guiones de los mismos. El término "aminoácido que no es codificado naturalmente" también incluye, pero no se limita a, los aminoácidos que se presentan mediante la modificación (por ejemplo, modificaciones posteriores a la traducción) de un aminoácido codificado naturalmente (incluyendo, pero no limitándose a, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina, pirrolina-carboxi-lisina, y selenocisteína) pero que ellos mismos no se incorporan naturalmente en una cadena de polipéptido en crecimiento mediante el complejo de la traducción. Los ejemplos de estos aminoácidos que no se presentan naturalmente incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-glucosaminil-L-serina, N-acetil-glucosaminil-L-treonina, y O-fosfo-tirosina.

Un aminoácido que no es codificado naturalmente es típicamente cualquier estructura que tenga cualquier cadena lateral sustituyente diferente de una que se utilice en los veinte aminoácidos naturales. Debido a que los aminoácidos no codificados naturalmente de la invención típicamente difieren de los aminoácidos naturales solamente en la estructura de la cadena lateral, los aminoácidos no codificados naturalmente forman enlaces de amida con otros aminoácidos, incluyendo, pero no limitándose a, naturalmente o no naturalmente codificados, de la misma manera en donde se forman en polipéptidos que se presentan naturalmente. Sin embargo, los aminoácidos no codificados naturalmente tienen grupos de cadena lateral que

los distinguen de los aminoácidos naturales. Por ejemplo, R opcionalmente comprende un grupo alquil-, aril-, acil-, ceto-, azido-, hidroxi-, hidrazina, ciano-, halo-, hidrazida, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, seleno-, sulfonil-, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina, amino, o similares, o cualquier combinación de los mismos. Otros aminoácidos que no se presentan naturalmente de interés que pueden ser adecuados para utilizarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los aminoácidos que comprenden un reticulante fotoactivable, aminoácidos marcados por centrifugación, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos de enlace a metales, aminoácidos que contienen metales, aminoácidos radioactivos, aminoácidos con grupos funcionales novedosos, aminoácidos que interactúan covalentemente o no covalentemente con otras moléculas, aminoácidos fotoenjaulados y/o foto-isomerizables, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de biotina, aminoácidos glucosilados, tales como una serina sustituida por azúcar, otros aminoácidos modificados por carbohidratos, aminoácidos que contienen ceto, aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter, aminoácidos sustituidos por átomo pesado, aminoácidos químicamente disociables y/o fotodisociables, aminoácidos con cadenas laterales alargadas comparándose con los aminoácidos naturales, incluyendo, pero no limitándose a, poliéteres o hidrocarburos de cadena larga, incluyendo, pero no limitándose a, de más de aproximadamente 5 o más de aproximadamente 10 átomos de carbono, aminoácidos que contienen azúcar enlazado a carbono, aminoácidos activos en reducción/oxidación (redox), aminoácidos que contienen tioaminoácidos, y aminoácidos que comprenden una o más fracciones tóxicas.

Los aminoácidos no codificados naturalmente de ejemplo que pueden ser adecuados para utilizarse en la presente invención y que son útiles para las reacciones con polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, aquéllos con grupos reactivos de carbonilo, amino-oxilo, hidrazina, hidrazida, semicarbazida, azida, y alquino. En algunas realizaciones, los aminoácidos no codificados naturalmente comprenden una fracción de sacárido. Los ejemplos de estos aminoácidos incluyen N-acetil-L-glucosaminil-L-serina, N-acetil-L-galactosaminil-L-serina, N-acetil-L-glucosaminil-L-treonina, N-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina y O-manosaminil-L-serina. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen los ejemplos en donde el enlace de N u O que se presenta naturalmente entre el aminoácido y el sacárido es reemplazado por un enlace covalente no comúnmente encontrado en la naturaleza -- incluyendo, pero no limitándose a, un alqueno, una oxima, un tioéter, una amida, y similares. Los ejemplos de esos aminoácidos también incluyen sacáridos que no son comúnmente encontrados en las proteínas que se presentan naturalmente, tales como 2-desoxi-glucosa, 2-desoxi-galactosa y similares.

Otro tipo de modificación que se puede introducir opcionalmente en las proteínas de ANGPTL3 de la invención (por ejemplo, dentro de la cadena de polipéptido o en cualquiera del término N o el término C), por ejemplo, para extender la vida media *in vivo*, es la PEGilación o la incorporación de polímeros de polietilenglicol (PEG) de cadena larga. La introducción de PEG o de polímeros de PEG de cadena larga aumenta el peso molecular efectivo de los presentes polipéptidos, por ejemplo, para prevenir la filtración rápida en la orina. En algunas realizaciones, se conjuga un residuo de lisina en la secuencia de ANGPTL3 con PEG directamente o a través de un enlazador. Este enlazador puede ser, por ejemplo, un residuo de Glu o un residuo de acilo que contenga un grupo tiol funcional para el enlace a la cadena de PEG apropiadamente modificada. Un método alternativo para introducir una cadena de PEG es primero introducir un residuo Cys en el término C o en los residuos expuestos al solvente, tales como los reemplazos para los residuos Arg o Lys. Este residuo Cys entonces se une específicamente en el sitio a una cadena de PEG que contenga, por ejemplo, una función de maleimida. Los métodos para incorporar PEG o polímeros de PEG de cadena larga son bien conocidos en la materia (descritos, por ejemplo, en Veronese, F. M. et al., *Drug Disc. Today* 10: 1451-8 (2005); Greenwald, R. B. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev*. 55: 217-50 (2003); Roberts, M. J. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54: 459-76 (2002)), el contenido de los cuales se incorpora a la presente como referencia. En la presente invención también se pueden emplear otros métodos para la conjugación de polímeros conocidos en la materia. En algunas realizaciones, se introduce la poli-(2-metacriloiloxi-etil-fosforil-colina) (PMPC) como un polímero conjugado con las proteínas de ANGPTL3 de la invención (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO2008/098930; Lewis et al., *Bioconjug Chem*., 19: 2144-55 (2008)). En algunas realizaciones, se puede utilizar un polímero que contenga fosforil-colina conjugado con las proteínas de ANGPTL3 en la presente invención. Una persona con experiencia reconocería fácilmente que se pueden utilizar otros conjugados poliméricos biocompatibles.

Con los presentes polipéptidos se puede llevar a cabo un planteamiento alternativo más recientemente reportado para incorporar PEG o polímeros de PEG a través de la incorporación de aminoácidos no naturales (como se describe anteriormente). Este planteamiento utiliza un par de sintetasas de ARNt/ARNt evolucionadas y es codificado en el plásmido de expresión por el codón de supresión ámbar (Deiters, A et al., (2004). *Bio-org. Med. Chem. Lett.* 14, 5743-5). Por ejemplo, la p-azido-fenilalanina se puede incorporar en los presentes polipéptidos, y entonces se hace reaccionar con un polímero de PEG que tiene una fracción de acetileno en la presencia de un agente reductor y iones de cobre con el objeto de facilitar una reacción orgánica conocida como " cicloadición-[3+2] de Huisgen".

En ciertos aspectos, la presente divulgación también contempla mutaciones específicas de las proteínas de ANGPTL3 para alterar la glucosilación del polipéptido. Estas mutaciones se pueden seleccionar como para introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación, incluyendo, pero no limitándose a, los sitios de

glucosilación O-enlazados o N-enlazados. En ciertas realizaciones, las proteínas de ANGPTL3 de la presente invención tienen sitios de glucosilación y patrones no alterados en relación con las proteínas de ANGPTL3 que se presentan naturalmente. En ciertas realizaciones, una variante de proteínas de ANGPTL3 incluye una variante de glucosilación en donde el número y/o tipo de sitios de glucosilación se ha alterado en relación con las proteínas de ANGPTL3 que se presentan naturalmente. En ciertas realizaciones, una variante de un polipéptido comprende un número mayor o menor de sitios de glucosilación N-enlazados en relación con un polipéptido nativo. Un sitio de glucosilación N-enlazado se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácidos para crear esta secuencia proporciona un nuevo sitio potencial para la adición de una cadena de carbohidrato N-enlazada. De una manera alternativa, las sustituciones que eliminan esta secuencia removerán una cadena de carbohidrato N-enlazada existente. En ciertas realizaciones, se proporciona una reconfiguración de cadenas de carbohidrato N-enlazadas, en donde se eliminan uno o más sitios de glucosilación N-enlazados (típicamente aquéllos que se presentan naturalmente), y se crean uno o más nuevos sitios N-enlazados.

Las variantes de proteínas de ANGPTL3 de ejemplo incluyen las variantes de cisteína en donde uno o más residuos de cisteína son suprimidos o son sustituidos por otro aminoácido (por ejemplo, serina) en relación con la secuencia de aminoácidos de las proteínas de ANGPTL3 que se presentan naturalmente. En ciertas realizaciones, las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando se deben replegar las proteínas de ANGPTL3 en una conformación biológicamente activa, tal como después del aislamiento de los cuerpos de inclusión insolubles. En ciertas realizaciones, las variantes de cisteína tienen más pocos residuos de cisteína que el polipéptido nativo. En ciertas realizaciones, las variantes de cisteína tienen un número par de residuos de cisteína para minimizar las interacciones resultantes de las cisteínas no emparejadas.

En algunas realizaciones, las variantes funcionales o las formas modificadas de las proteínas de ANGPTL3 incluyen proteínas de fusión de una proteína de ANGPTL3 de la invención, y uno o más dominios de fusión. Los ejemplos bien conocidos de dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutationa-S-transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de enlace a maltosa (MBP), y/o albúmina de suero humano (HSA). Se puede seleccionar un dominio de fusión o un fragmento del mismo para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía por afinidad. Para el propósito de la purificación de afinidad, se utilizan las matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutationa, amilasa, y níquel o cobalto. Muchas de estas matrices están disponibles en una forma de "kit", tal como el sistema de purificación de GST Pharmacia y el sistema QLAexpress^{MR} (Qiagen) útil con los componentes de fusión (HIS_6). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión con el objeto de facilitar la detección de las proteínas de ANGPTL3. Los ejemplos de estos dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP), así como las "marcas de epítopos", las cuales son usualmente secuencias peptídicas cortas para las cuales está disponible un anticuerpo específico. Las marcas de epítopos bien conocidas para las cuales están fácilmente disponibles los anticuerpos monoclonales específicos incluyen FLAG, hemaglutinina (HA) de virus de influenza, y marcas c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de disociación de proteasa, tal como para el Factor Xa o Trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y de esta manera libere las proteínas recombinantes de la misma. Las proteínas liberadas entonces se pueden aislar del dominio de fusión mediante la separación cromatográfica subsiguiente. En ciertas realizaciones, una proteína de ANGPTL3 se fusiona con un dominio que estabiliza la proteína de ANGPTL3 *in vivo* (un dominio "estabilizante"). "Estabilizante" significa cualquier cosa que aumente la vida media en suero, independientemente de si esto es debido a una destrucción reducida, a una eliminación reducida por parte del riñón, o a otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a una amplia gama de proteínas. De la misma manera, Las fusiones con albúmina de suero humano pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar incluyen dominios de multimerización (por ejemplo, de dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, como sea deseado). Las fusiones se pueden construir de tal manera que el péptido heterólogo se fusione en el término amino de un polipéptido de la invención y/o en el término carboxilo de un polipéptido de la invención.

Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de angiopoietina tipo 3 resistentes a la proteasa

La divulgación también proporciona ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos resistentes a la proteasa de la invención y vectores de expresión y células huésped para la expresión de un polipéptido resistente a la proteasa. En otros aspectos, la invención proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención y vectores de expresión y células huésped que comprenden este polinucleótido. En algunas realizaciones, el polinucleótido se optimiza para la expresión en las células huésped. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para mitigar o prevenir artritis o lesión de las articulaciones en un paciente humano, comprendiendo el método: administrar a una articulación del paciente, un vector de expresión que codifique un polipéptido de la invención, sobre lo cual, la expresión del polipéptido mitiga o previene la artritis o la lesión de las articulaciones en el paciente. En algunas realizaciones, el paciente tiene

artritis o lesión de las articulaciones. En algunas realizaciones, el individuo no tiene, pero está en riesgo de tener, artritis o lesión de las articulaciones. En algunas realizaciones, la artritis es osteoartritis, artritis por trauma, o artritis autoinmune.

La expresión de los polipéptidos de la divulgación emplea técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que dan a conocer los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook y Russell Editores (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Edición; la serie Ausubel et al., Editores (2007 con actualización hasta el 2010) Current Protocols in Molecular Biology, entre otros conocidos en la materia.

La expresión puede emplear cualesquiera células huésped apropiadas conocidas en la materia, por ejemplo, células huésped de mamífero, células huésped bacterianas, células huésped de levadura, células huésped de insecto, etc. Los sistemas de expresión tanto procarióticos como eucarióticos están ampliamente disponibles. En algunas realizaciones, el sistema de expresión es la expresión en una célula de mamífero, tal como un sistema de expresión en una célula de CHO. En algunas realizaciones, se pueden optimizar los codones de un ácido nucleico con el objeto de facilitar la expresión en una célula huésped deseada.

Los vectores y sistemas no virales[0002] incluyen plásmidos y vectores episómicos, que típicamente comprenden un casete de expresión para la expresión de una proteína o ARN, y cromosomas artificiales humanos (véase, por ejemplo, Harrington et al., Nat Genet 15: 345, 1997). Por ejemplo, los vectores no virales útiles para la expresión de los polipéptidos de la invención en células de mamífero (por ejemplo, humanas) incluyen pThioHis A, B y C, pcDNA3. I/His, pEBVHis A, B y C (Invitrogen, San Diego, CA), los vectores MPSV, y otros numerosos vectores conocidos en la materia para la expresión de otras proteínas. Los vectores virales útiles incluyen, pero no se limitan a, vectores basados en adenovirus, virus adenoasociados, virus de Herpes, vectores basados en SV40, virus de papiloma, virus HBP Epstein Barr, vectores de varicela de aves, vectores de virus de vacuna, y virus de Semliki Forest (SFV).

La elección del vector de expresión depende de las células huésped destinadas en las que se vaya a expresar el vector. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadores) que se enlazan operativamente a los polinucleótidos que codifican un polipéptido de la invención. En algunas realizaciones, se emplea un promotor inducible para prevenir la expresión de las secuencias insertadas excepto bajo condiciones de inducción. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, un promotor de metalotioneína, un promotor de glucocorticoide, o un promotor de choque por calor. En adición, también se pueden incorporar otros elementos reguladores para mejorar la expresión de un ácido nucleico que codifique un polipéptido de la invención, por ejemplo, potenciadores, sitio de enlace ribosomal, secuencias de terminación de transcripción, y similares.

En algunos aspectos de la divulgación, un ácido nucleico que codifique un polipéptido de la invención también puede incluir una secuencia que codifique una secuencia de secreción de señales, de tal manera que el polipéptido sea secretado a partir de la célula huésped. Esta secuencia puede ser proporcionada por el vector, o como parte del ácido nucleico de ANGPTL3 que esté presente en el vector.

Los métodos para introducir vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, comúnmente se utiliza la transfección con cloruro de calcio para las células procarióticas, mientras que se puede utilizar el tratamiento con fosfato de calcio o electroporación para otros huéspedes celulares (véase en términos generales *Sambrook et al., supra*). Otros métodos incluyen, por ejemplo, electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, conjugados de policatión:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión con la proteína estructural VP22 del virus de Herpes, absorción de AND potenciada por el agente, y transducción *ex vivo*. Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de las proteínas recombinantes, con frecuencia se deseará la expresión estable. Por ejemplo, se pueden preparar líneas celulares que expresen establemente los polipéptidos de la invención utilizando los vectores de expresión de la invención que contienen orígenes de replicación virales o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable.

En algunos aspectos de la divulgación, los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos resistentes a la proteasa de ANGPTL3 de la invención se pueden suministrar a un paciente para el tratamiento de una lesión o enfermedad relacionada con las articulaciones. El suministro de estos ácidos nucleicos se puede lograr utilizando cualquier medio conocido en la materia, pero típicamente se lleva a cabo utilizando inyección directa en la articulación afectada. En algunas realizaciones, al ADN se suministra como el ADN desnudo utilizando inyección directa en la articulación. En algunas realizaciones, se emplea un vector viral, incluyendo, pero no limitándose a, un vector de adenovirus o asociado con adenovirus, un vector de virus de Herpes, virus de varicela de aves, o un vector de virus de vacuna.

Métodos de uso terapéutico de los polipéptidos, e indicaciones

Los métodos proporcionados de la invención incluyen una composición farmacéutica que comprende los polipéptidos de la invención para uso en el tratamiento de un sujeto, el cual comprende administrar al sujeto, una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la invención, en donde el sujeto tiene o está en riesgo de tener daño de las articulaciones o artritis. La invención también proporciona un método para mitigar o prevenir artritis o lesión de las articulaciones en un paciente humano, comprendiendo el método: administrar a una articulación del paciente, una composición que comprenda una cantidad efectiva de un polipéptido de la invención, mitigando de esta manera o previniendo la artritis o la lesión de las articulaciones en el paciente. En algunas realizaciones, el paciente tiene artritis o lesión de las articulaciones. En algunas realizaciones, el individuo no tiene, pero está en riesgo de tener, artritis o lesión de las articulaciones. En algunas realizaciones, la artritis es osteoartritis, artritis por trauma, o artritis autoinmune. En algunas realizaciones, la composición administrada comprende además ácido hialurónico.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para inducir la diferenciación de las células madre mesenquimales hasta condrocitos, comprendiendo el método, poner en contacto las células madre mesenquimales con una cantidad suficiente de un polipéptido de la invención, con el objeto de inducir la diferenciación de las células madre hasta condrocitos. En algunas realizaciones, el método se lleva a cabo *in vivo* y las células madre están presentes en un paciente humano.

Se contempla que los polipéptidos, las composiciones, y los usos de la presente invención se pueden utilizar para tratar, mitigar o prevenir cualquier tipo de daño articular de cartílagos (por ejemplo, daño o lesión de las articulaciones) incluyendo, por ejemplo, el daño que se presente a partir de un incidente traumático o por desgarre de tendones o ligamentos. En algunas realizaciones, las proteínas de la invención se administran para prevenir o mitigar artritis o daño de las articulaciones, por ejemplo, en donde hay una historia genética o familiar de artritis o daño de las articulaciones o lesión de las articulaciones, o antes o durante la cirugía de articulaciones. En algunas realizaciones, los polipéptidos, las composiciones y los métodos se utilizan para tratar daño de las articulaciones. En las realizaciones particulares, el daño de las articulaciones es lesión traumática de las articulaciones. En otras realizaciones, el daño de las articulaciones es daño que se presenta por la edad o por inactividad. En todavía otras realizaciones, el daño de las articulaciones es daño que se presenta a partir de un trastorno autoinmune. En algunas realizaciones de la invención, los polipéptidos, las composiciones, y los métodos de la presente invención se pueden utilizar para tratar, mitigar o prevenir osteoartritis. En algunas realizaciones, los polipéptidos, las composiciones, y los métodos se utilizan para mitigar o prevenir la artritis en un sujeto en riesgo de tener o adquirir artritis. En algunas realizaciones, los polipéptidos, las composiciones, y los métodos se utilizan para mitigar o prevenir el daño de las articulaciones en un sujeto en riesgo de tener o adquirir daño de las articulaciones.

En algunas realizaciones, los polipéptidos y composiciones de la presente invención se usan en un método para estimular la proliferación de condrocitos y la producción de cartílago en tejidos cartilaginosos que se hayan dañado, por ejemplo, debido a lesión traumática o condropatía. En las realizaciones particulares, los polipéptidos, las composiciones, y los métodos de la presente invención son útiles para el tratamiento de daño de cartílagos en las articulaciones, por ejemplo, en las superficies articuladas, por ejemplo, columna, hombro, codo, muñeca, articulaciones de los dedos, cadera, rodilla, tobillo, y articulaciones de los pies. Los ejemplos de las enfermedades o los trastornos que se pueden beneficiar a partir del tratamiento incluyen osteoartritis, artritis reumatoide, otras enfermedades autoinmunes, u osteocondritis disecante. En adición, el daño o la alteración de los cartílagos se presenta como un resultado de ciertos trastornos genéticos o metabólicos, mala formación del cartílago que se ve con frecuencia en las formas de enanismo en los seres humanos, y/o daño o alteración de cartílagos que con frecuencia es un resultado de cirugía reconstructiva; por consiguiente, los polipéptidos, las composiciones, y los métodos serían una terapia útil en estos pacientes, ya sea solos o en relación con otros planteamientos.

Además se contempla que los polipéptidos y las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para tratar, mitigar o prevenir diversos trastornos cartilaginosos y/o los síntomas asociados o efectos de estas condiciones. Las condiciones o los trastornos de ejemplo para el tratamiento, la mitigación y/o la prevención con los polipéptidos, las composiciones, y los métodos de la invención, incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, osteoartritis, enfermedad degenerativa de disco, espondiloartropatías, síndrome de Ehlers Danlos, esclerosis sistémica (esclerodermia) o enfermedad de tendones. Otras condiciones o trastornos que se pueden beneficiar a partir del tratamiento con los polipéptidos para mitigar los efectos asociados incluyen miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjogren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria nocturna paroxismal), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia inmunológicamente mediada), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal inmunológicamente mediada (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barr, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares, tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis autoinmune activa crónica, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerativa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten,

y enfermedad de Whipple, enfermedades autoinmunes o inmunológicamente mediadas de la piel, incluyendo enfermedades ampollares de la piel, eritema multiforme y dermatitis por contacto, soriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tales como neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas con trasplantes, incluyendo rechazo de injerto y enfermedad del injerto contra el huésped.

Un “paciente", como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier sujeto al que se administre un polipéptido terapéutico de la invención. Se contempla que los polipéptidos, las composiciones, y los métodos de la presente invención se pueden utilizar para tratar a un mamífero. Como se utiliza en la presente, un “sujeto” se refiere a cualquier mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos, o de mascota, tales como ganado (por ejemplo, reses), caballos, perros, ovejas, cerdos, conejos, cabras, gatos, etc. En algunas realizaciones de la invención, el sujeto es un ser humano. En ciertas realizaciones, el sujeto es un caballo. En otras realizaciones, el sujeto es un perro.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la invención pueden ser heterólogos para el mamífero que se vaya a tratar. Por ejemplo, una proteína de ANGPTL3 humana o fragmentos de la misma, o una proteína o péptido derivado a partir de una proteína de ANGPTL3 humana (por ejemplo, una proteína de ANGPTL3 humana modificada, una variante conservadora de una proteína de ANGPTL3 humana, un peptidomimético derivado a partir de una proteína de ANGPTL3 humana), se utiliza en el tratamiento de un animal, tal como un equino, bovino o canino. En algunas realizaciones, se puede utilizar una proteína de ANGPTL3 heteróloga para expandir las poblaciones de condrocitos en cultivo para trasplante. En algunas realizaciones, los cultivos expandidos entonces se mezclarán opcionalmente con polipéptidos y composiciones homólogas para el mamífero que se vaya a tratar, y se colocarán en el espacio de la articulación o directamente en el defecto del cartílago. De una manera alternativa, los polipéptidos de la invención se derivan a partir de la misma especie, es decir, se utiliza una proteína de ANGPTL3 humana o fragmentos de la misma, o una proteína o péptido derivado a partir de una proteína de ANGPTL3 humana (por ejemplo, una proteína de ANGPTL3 humana modificada, una variante conservadora de una proteína de ANGPTL3 humana, un peptidomimético derivado a partir de una proteína de ANGPTL3 humana), en el tratamiento de un paciente humano. Mediante el uso de una proteína derivada a partir de la misma especie de mamífero que el que se esté tratando, se pueden evitar las respuestas inmunitarias inadvertidas.

En algunas realizaciones, los polipéptidos y las composiciones de la presente invención se aplican mediante la inyección directa en el fluido sinovial de una articulación, la administración sistémica (oral o intravenosamente) o directamente en un defecto del cartílago, ya sea solas o formando complejo con un vehículo adecuado para la liberación prolongada de la proteína. En algunas realizaciones, los polipéptidos o las composiciones se administran en una matriz biocompatible o en un andamiaje. Los polipéptidos, las composiciones, y los métodos de la presente invención también se pueden utilizar en conjunto con un procedimiento quirúrgico en una articulación afectada. La administración de un polipéptido de la invención se puede presentar antes, durante o en conjunto con, y/o después de un procedimiento quirúrgico. Por ejemplo, los polipéptidos, las composiciones y los métodos de la invención se pueden utilizar para expandir las poblaciones de condrocitos en cultivo para la implantación autóloga o alogénica de condrocitos (ACI). Los condrocitos pueden ser opcionalmente implantados con un tratamiento concurrente que consiste en la administración de los polipéptidos y las composiciones de la presente invención. En estos procedimientos, por ejemplo, los condrocitos se pueden cosechar artroscópicamente a partir del área de apoyo de carga menor no lesionada de una articulación dañada, y se pueden cultivar *in vitro*, opcionalmente en la presencia de los polipéptidos y las composiciones de la presente invención y/u otros factores de crecimiento para aumentar el número de células antes del trasplante. Los cultivos expandidos entonces se mezclan opcionalmente con los polipéptidos y las composiciones de la presente invención y/o se colocan en el espacio de la articulación o directamente en el defecto. En ciertas realizaciones, los cultivos expandidos (opcionalmente con los polipéptidos de la presente invención) se colocan en el espacio de la articulación suspendidos en una matriz o membrana. En otras realizaciones, los polipéptidos y las composiciones de la presente invención, se pueden utilizar en combinación con uno o más injertos periosteales o pericondriales que contengan células formadoras de cartílago y/o que ayuden a sostener los condrocitos o las células precursoras de controcitos trasplantadas en su lugar. En algunas realizaciones, los polipéptidos y las composiciones de la presente invención, se utilizan para reparar el daño de los cartílagos en conjunto con otros procedimientos, incluyendo, pero no limitándose a, lavado de una articulación, estimulación de médula ósea, artroplastía de abrasión, perforación subcondral, o microfractura de hueso subcondral proximal. Opcionalmente, después de la administración de los polipéptidos y las composiciones de la presente invención y del crecimiento del cartílago, puede ser benéfico un tratamiento quirúrgico adicional para contornear adecuadamente las superficies de cartílago recién formadas.

Composiciones Farmacéuticas

Las composiciones terapéuticas que comprenden los polipéptidos proporcionados están dentro del alcance de la presente invención, y se contemplan específicamente a la luz de la identificación de varias secuencias de polipéptidos exhiben una mejor estabilidad y resistencia a la proteasa. Por consiguiente, en un aspecto

adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica, la cual comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de la invención. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden además un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende además un ácido hialurónico, o un derivado del mismo.

En adición, la invención proporciona polipéptidos para uso en el tratamiento, para mitigar o prevenir artritis o lesión de las articulaciones en un paciente humano, comprendiendo el método: administrar a una articulación del paciente, una composición que comprende una cantidad efectiva de un polipéptido de la invención, mitigando de esta manera o previniendo la artritis o la lesión de las articulaciones en el paciente. En algunas realizaciones, el paciente tiene artritis o lesión de las articulaciones. En algunas realizaciones, el individuo no tiene, pero está en riesgo de tener, artritis o lesión de las articulaciones. En algunas realizaciones, la artritis es osteoartritis, artritis por trauma, o artritis autoinmune. En algunas realizaciones, la composición administrada comprende además ácido hialurónico.

En otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos para uso en un método para inducir la diferenciación de las células madre mesenquimales hasta condrocitos, comprendiendo el método, poner en contacto las células madre mesenquimales con una cantidad suficiente de un polipéptido de la invención, con el objeto de inducir la diferenciación de las células madre hasta condrocitos. En algunas realizaciones, el método se lleva a cabo *in vivo*, las células madre están presentes en un paciente humano, y el contacto comprende administrar a una articulación del paciente, una composición que comprende una cantidad efectiva de un polipéptido de la invención, induciendo de esta manera la diferenciación de las células madre hasta condrocitos, y la generación de cartílago.

Las composiciones terapéuticas que comprenden ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención se pueden suministrar a un paciente para el tratamiento de una lesión o enfermedad relacionada con las articulaciones, y también están dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden ADN desnudo que codifica un polipéptido de la invención. En algunas realizaciones, se emplea un vector viral para efectuar el suministro, y una composición farmacéutica comprende un vector que codifica un polipéptido de la invención, incluyendo, pero no limitándose a, un vector de adenovirus o asociado con adenovirus, un vector de virus de Herpes, virus de varicela de aves, o un vector de virus de vacuna. Las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención con un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable.

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan polipéptidos para utilizarse como un medicamento para el tratamiento del daño de las articulaciones. En ciertas realizaciones, se proporcionan los polipéptidos de la invención para utilizarse como un medicamento para mitigar la artritis o el daño de las articulaciones. En algunas realizaciones, la artritis es osteoartritis, artritis por trauma o artritis autoinmune. En algunas realizaciones, el daño de las articulaciones es lesión traumática de las articulaciones, daño autoinmune, daño relacionado con el envejecimiento, o daño relacionado con inactividad. En otras realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, para utilizarse en un medicamento.

Las formulaciones adecuadas para su administración incluyen excipientes, incluyendo, pero no limitándose a, soluciones acuosas y no acuosas, soluciones isotónicas estériles, las cuales pueden contener antioxidantes, reguladores, bacteriostáticos, y solutos que hagan a la formulación isotónica, y suspensiones acuosas y no acuosas estériles, las cuales pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, y conservadores. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido en mezcla con un agente de formulación farmacéuticamente aceptable seleccionado por su idoneidad con el modo de administración, el formato de suministro, y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª Edición, A.R. Gennaro, Editor, Mack Publishing Company 1990), y las siguientes ediciones del mismo. El vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de una naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado para inyección puede ser agua, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, opcionalmente complementado con otros materiales comunes en las composiciones para su administración parenteral. Por ejemplo, se pueden utilizar reguladores del pH, por ejemplo, para mantener la composición en un pH fisiológico o en un pH ligeramente más bajo, típicamente dentro de un intervalo de aproximadamente un pH de 5 a aproximadamente un pH de 8, y pueden incluir opcionalmente sorbitol, albúmina de suero, detergente, o otro componente adicional. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, se pueden preparar para su almacenamiento en una forma liofilizada utilizando excipientes apropiados (por ejemplo, sacarosa).

En todavía otras realizaciones, la formulación con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos, perlas, o liposomas u otra matriz biocompatible que proporcione una liberación controlada o sostenida del polipéptido o del ácido nucleico que codifique un polipéptido de la invención, entonces se puede suministrar por medio de una inyección de depósito. Por ejemplo, los

polipéptidos o el ácido nucleico que codifique un polipéptido de la invención, se pueden encapsular en liposomas, o se pueden formular como micropartículas o microcápsulas, o se pueden incorporar en otros vehículos, tales como polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas (véanse, por ejemplo, Gonzalez et al., 1999, Bioconjugate Chem., 10, 1068-1074; Wang et al., Publicaciones Internacionales del TCP Números WO 03/47518 y WO 03/46185), poli- ácido-(láctico-co-glicólico) (PLGA), y microesferas de PLCA (véanse, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,447,796 y la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 2002130430), nanocápsulas biodegradables, y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteináceos (O'Hare y Normand, Publicación Internacional del TCP Número WO 00/53722), o mediante el uso de conjugados. Todavía otros mecanismos de suministro adecuados incluyen dispositivos de suministro implantables.

La dosis de un compuesto de la presente invención, para el tratamiento de las enfermedades o los trastornos anteriormente mencionados, varía dependiendo de la forma de administración, de la edad y/o el peso corporal del sujeto, y de la condición del sujeto que se vaya a tratar, y por último será decidida por el médico o veterinario que atienda. La dosis administrada a un sujeto, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para efectuar una respuesta benéfica en el sujeto a través del tiempo. Esta dosis es una “cantidad terapéuticamente efectiva”. De conformidad con lo anterior, una dosis apropiada se puede determinar por la eficacia de la proteína particular o del ácido nucleico que codifique un polipéptido de la invención empleado, y la condición del sujeto, así como el peso corporal o área superficial de la zona que se vaya a tratar. El tamaño de la dosis también será determinado por la existencia, naturaleza, y extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañen a la administración de una proteína o vector particular en un sujeto particular. La administración se puede llevar a cabo por medio de dosis individuales o divididas, o como a infusión continua por medio de un dispositivo de implantación o un catéter. La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del polipéptido o del ácido nucleico que codifique un polipéptido de la invención, en la formulación utilizada. Un clínico puede titular la dosificación y/o puede modificar la administración para lograr los efectos terapéuticos deseados. Una dosificación típica está en el intervalo de aproximadamente 0.01 microgramos/kilogramo a aproximadamente 100 miligramos/ kilogramo, dependiendo de los factores. En ciertas realizaciones, una dosificación está en el intervalo de aproximadamente 0.1 microgramos/kilogramo hasta aproximadamente 10 miligramos/ kilogramo; o de aproximadamente 0.1 microgramos/kilogramo; aproximadamente 0.5 microgramos/kilogramo; aproximadamente 1 microgramo/kilogramo; aproximadamente 2 microgramos/kilogramo; aproximadamente 5 microgramos/kilogramo; aproximadamente 10 microgramos/kilogramo; aproximadamente 15 microgramos/ kilogramo; aproximadamente 20 microgramos/kilogramo; aproximadamente 25 microgramos/kilogramo; aproximadamente 30 microgramos/kilogramo; aproximadamente 35 microgramos/ kilogramo; aproximadamente 40 microgramos/kilogramo; aproximadamente 45 microgramos/kilogramo; aproximadamente 50 microgramos/kilogramo; aproximadamente 55 microgramos/ kilogramo; aproximadamente 60 microgramos/kilogramo; aproximadamente 65 microgramos/kilogramo; aproximadamente 75 microgramos/kilogramo; aproximadamente 85 microgramos/ kilogramo; aproximadamente 100 microgramos/kilogramo. En ciertas realizaciones, una dosificación es de aproximadamente 50 microgramos/kilogramo; de aproximadamente 100 microgramos/ kilogramo; aproximadamente 150 microgramos/kilogramo; aproximadamente 200 microgramos/kilogramo; aproximadamente 250 microgramos/kilogramo; aproximadamente 300 microgramos/ kilogramo; aproximadamente 350 microgramos/kilogramo; aproximadamente 400 microgramos/kilogramo; aproximadamente 450 microgramos/kilogramo; aproximadamente 500 microgramos/ kilogramo; aproximadamente 550 microgramos/kilogramo; aproximadamente 600 microgramos/kilogramo; aproximadamente 650 microgramos/kilogramo; aproximadamente 700 microgramos/ kilogramo; aproximadamente 750 microgramos/kilogramo; aproximadamente 800 microgramos/kilogramo; aproximadamente 850 microgramos/kilogramo; aproximadamente 900 microgramos/ kilogramo; aproximadamente 950 microgramos/kilogramo; aproximadamente 1 miligramo/kilogramo; aproximadamente 2 miligramos/kilogramo; aproximadamente 3 miligramos/kilogramo; aproximadamente 4 miligramos/kilogramo; aproximadamente 5 miligramos/kilogramo; aproximadamente 6 miligramos/kilogramo; aproximadamente 7 miligramos/kilogramo; aproximadamente 8 miligramos/kilogramo; aproximadamente 9 miligramos/kilogramo; aproximadamente 10 miligramos/kilogramo.

Métodos de Administración

Se puede emplear cualquier método para suministrar las proteínas o un ácido nucleico que codifique un polipéptido de la invención a una articulación afectada. En la práctica de esta invención, las composiciones se pueden administrar parenteralmente, por ejemplo, se pueden inyectar, por ejemplo, intra-articularmente (es decir, en una articulación), intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente; se pueden infundir, o implantar, por ejemplo, en una membrana, matriz, dispositivo, etc. Cuando se inyectan, se infunden o se implantan, el suministro se puede dirigir hacia el tejido o la articulación adecuada, y el suministro puede ser un suministro de bolo directo o un suministro continuo. En algunas realizaciones, el suministro puede ser hacia un tejido adecuado localizado en estrecha proximidad a una articulación afectada. En algunas realizaciones, el suministro puede ser por medio de difusión, o por medio de un bolo de liberación temporizada. En algunas realizaciones, se puede colocar un sistema de liberación controlada (por ejemplo, una bomba) en proximidad

al objetivo terapéutico, por ejemplo, la articulación a la cual se administre el polipéptido. En otras realizaciones, las composiciones se pueden seleccionar para ingestión, por ejemplo, inhalación o suministro oral.

Los polipéptidos terapéuticos de la presente invención también se pueden utilizar efectivamente en combinación con uno o más agentes activos adicionales (por ejemplo, el ácido hialurónico, o un derivado o una sal del mismo, un factor de crecimiento (por ejemplo, FGF18, BMP7), un agente condrogénico (por ejemplo, calcitonina de salmón oral, SD-6010 (inhibidor de iNOS), vitamina D3 (colecalciferol), hidrolizado de colágeno, acetato de rusalatida, insaponificables de soya-aguacate (ASU), un compuesto descrito en la Publicación Internacional Número WO2012/129562, cartogenina), un esteroide, un agente anti-inflamatorio no esteroideo (NSAID), etc.), dependiendo de la terapia o efecto deseado para mejorar o potenciar el efecto terapéutico de cualquiera de los mismos. Este proceso puede involucrar la administración de ambos agentes al paciente al mismo tiempo, ya sea como una sola composición o formulación farmacológica que incluya ambos agentes, o mediante la administración de dos composiciones o formulaciones distintas, en donde una composición incluya un polipéptido o un polinucleótido que codifique un polipéptido de la invención, y el otro incluya el segundo agente. La administración de una composición terapéutica que comprenda un polipéptido o un polinucleótido que codifique un polipéptido de la invención puede preceder o seguir a la administración del segundo agente por intervalos que varían desde minutos hasta semanas.

Las formulaciones de los compuestos se pueden almacenar en frascos estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, o como un polvo deshidratado o liofilizado. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitaria o de múltiples dosis, tales como ampolletas y frascos. En algunas realizaciones, las formulaciones se pueden presentar en jeringas previamente llenadas de una sola cámara o de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquido, lisojeringas). Las soluciones y suspensiones se pueden preparar a partir de polvos, gránulos, y tabletas estériles de la clase anteriormente descrita.

También se divulgan kits que comprenden los polipéptidos o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. En una realización, se divulgan kits para producir una unidad de administración de una sola dosis. El kit comprende un primer recipiente, el cual comprende un polipéptido seco o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, y un segundo recipiente que tiene una fórmula de reconstitución acuosa. En ciertas realizaciones, un recipiente comprende una jeringa de una sola cámara previamente llenada. En otras realizaciones, los recipientes son abarcados como una jeringa de múltiples cámaras previamente llenada.

Ejemplificación

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1: Construcciones de péptidos de ANGPTL3 resistentes a la proteasa

Se construyeron diferentes mutantes de truncamiento N-terminal para eliminar las glucosilaciones O-enlazadas y para facilitar la caracterización biofísica de la proteína. Con el fin de identificar los péptidos resistentes a la proteasa, se introdujeron sustituciones de aminoácidos en diferentes posiciones de los fragmentos de péptidos de ANGPTL3 humana correspondientes a la región C-terminal del péptido. La Figura 1 muestra las posiciones de las mutaciones en la ANGPTL3 humana. Las construcciones se prepararon inicialmente con marcas His. Las proteínas mutantes fueron: 225-460 K423Q (225KQ), 225-460 S424T(225ST), 226-460 K423Q (226KQ), 226-460 K423S (226KS), 228-460 K423Q (228KQ), 228-460 S424T (228ST), 233-460 K423Q (233KQ), 233-460 K423S (233KS), 241-460 K423Q (241KQ), 241-460 K423S (241KS), 241-460 Kdel (241Kdel), 242-460 K423Q (242KQ), 242-460 K423S (242KS), y 242-460 Kdel (242Kdel).

Las proteínas marcadas con His se expresaron en células HEK Freestyle^{MR} y se purificaron mediante cromatografía en columna de Ni-NTA. También se clonaron las construcciones C- terminales sin marca, purificadas mediante el método anteriormente descrito (Gonzalez R et al. *PNAS* 2010). Dicho de una manera breve, la proteína objetivo con la secuencia de señal (1-16) se clonó en un vector de expresión de mamífero con un promotor de citomegalovirus. A las 96 horas después de la transfección de ADN/PEI en HEK 293 Freestyle (Invitrogen), el medio que contenía la proteína objetivo secretada se cosechó y se purificó mediante una columna Hi-Trap SP (GE Healthcare). La proteína se eluyó entre MES 50 mM (pH 6.0), NaCl 125 mM hasta MES 50 mM (pH de 6.0), NaCl 150 mM. La SDS-PAGE confirmó que la proteína purificada era cuando menos el 95 % pura.

La resistencia a la proteasa se evaluó como sigue. Se llevó a cabo una tripsinólisis limitada mediante la incubación de 10 nanogramos de cada proteína preparada con tripsina en una proporción de masa de 8000:1 (Proteína:Tripsina) durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción de tripsinólisis entonces se apagó mediante la adición de ácido acético para llevar la reacción hasta un pH de 3.0, y las muestras apagadas se analizaron mediante LC/MS. Fue evidente un pico de RP HPLC de 5 minutos correspondiente a la masa de los 43 aminoácidos C-terminales (S424-E460), para las construcciones de proteínas de tipo silvestre

respectivas. El sitio de sujeción estuvo en el mismo sitio, es decir, entre K423 y S424, como se observó durante la producción de la proteína de ANGPLT3 de tipo silvestre de longitud completa. Este pico estuvo ausente cuando Lys en el sitio de sujeción se mutó hasta Gln. Cada una de las construcciones de péptidos 225KQ, 228KQ, 233KQ, 233KS, 241KQ, y 242KQ, y el péptido 225 de tipo silvestre, se prepararon y se analizaron. El pico correspondiente a la masa de los 43 aminoácidos C-terminales estuvo ausente cuando Lys en el sitio de sujeción se mutó hasta Gln o Ser para cada una de las construcciones, o cuando Lys en la posición 423 se suprimió.

Ejemplo 2: Ensayos de enlace de integrina

Integrina αVß3. Los péptidos 225KQ, 228KQ, 233KQ, 241KQ y 242KQ preparados se probaron *in vitro* para determinar su enlace a la integrina αVß3. Dicho de una manera breve, las placas Maxisorp se recubrieron con 2 microgramos/mililitro de Integrina αVß3, y diversas concentraciones de la construcción del polipéptido (indicada). El péptido enlazado se detectó mediante la adición de mAb Anti-ANGPTL3, seguido por un anticuerpo de IgG de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de radícula roja. Todos los péptidos probados conservaron o mejoraron su capacidad de enlace a integrina. La EC_{50} para cada uno se determinó a partir de los datos de enlace, y los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Enlace de ANGPTL3 *in vitro* y construcciones de polipéptidos diseñadas para Integrinas

	Integrina α5ß1 EC_{50}	**Integrina αVß3 EC_{50}**
WT	3.054	3.245
242KQ	1.566	3.076
241KQ	2.693	4.032
233KQ	13.83	6.636
228KQ	4.26	4.051
225KQ	19.89	11.18

Integrina α5ß1 Los péptidos 225KQ, 228KQ, 233KQ, 241KQ y 242KQ preparados se probaron *in vitro* para determinar su enlace a la integrina α5ß1. Las placas se recubrieron con 2 microgramos/ mililitro como se describe anteriormente, pero con Integrina α5ß1, y se agregaron diversas concentraciones de la construcción del polipéptido (indicada), y la detección se llevó a cabo como se describe anteriormente. Todos los péptidos probados conservaron o mejoraron su capacidad de enlace a integrina. La EC_{50} para cada uno se determinó a partir de los datos de enlace, y los resultados se muestran en la Tabla 2.

Ejemplo 3: Análisis funcional de las construcciones

Cultivo y diferenciación celular. Las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana primarias (hMSCs) se clasificaron mediante FACS y se probó que eran >98 % positivas para CD29, CD44, CD166 y CD105 y <0.1 % positivas para CD45; y se utilizaron las células a partir de los pasajes 2 a 8 para los experimentos. Las MSCs residentes en cartílago humano (hCR-MSCs) se derivaron a partir de condrocitos articulares primarios humanos, los cuales se separaron en las células individuales, se hicieron crecer clonalmente en MSCGM, y se validaron como MSCs a través de la diferenciación condrogénica, osteogénica y adipogénica. Las células se clasificaron mediante FACS, y se probó que eran >98 % positivas para CD166 y CD105. Las hCR-MSCs se cultivaron hasta 20 pasajes sin ninguna alteración en los índices de perfil, crecimiento o diferenciación celular identificados.

Condrogénesis.Las construcciones de péptidos de la invención se evaluaron en ensayos físicos y funcionales para evaluar la actividad de condrogénesis.

Las construcciones diseñadas proporcionadas en la presente, se derivan a partir de ANGPTL3, que pertenece a una familia de siete proteínas de ANGPTL identificadas que tienen una similitud estructural con las angiopoietinas, pero carecen de la capacidad para enlazarse al receptor Tie2 y, por consiguiente, tienen distintas funciones. Las proteínas de ANGPTL contienen un dominio enrollado en espiral (CCD) N-terminal, y un dominio tipo fibrinógeno (FLD) C-terminal, y se cree que están estrechamente reguladas por su micro-medio ambiente y por las interacciones con la matriz extracelular (ECM), tal como fibronectina e integrinas. Conklin et al., Genomics 62(3): 477-482 (1999); Goh YY et al., Am J Pathol 177(6): 2791-2803 (2010); Goh YY et al., J Biol Chem 285(43): 32999-33009(2010). Las secuencias para los miembros de la familia de ANGPTL más estrechamente relacionados con ANGPTL3, ANGPTL1 (dominio de longitud completa y C-terminal), y ANGPTL4 (dominio de longitud completa y C-terminal), se proporcionan en la Tabla 3; y la Tabla 5B ilustra una alineación a través de los dominios C-terminales de estos miembros de la familia. Las identidades de secuencia a través de los dominios extracelulares y los dominios C-terminales de ANGPTL1, ANGPTL4, así como de otras proteínas de angiopoietina ANGPTL7, ANGPT1 y ANGPT2, se proporcionan en la Tabla 5A. El dominio C-terminal (CT) de ANGPTL3 comparte el 37 % de identidad de secuencia con el dominio C-terminal (CT) de ANGPTL1, y el 40 % de identidad de secuencia con el dominio C-terminal (CT) de ANGPTL4.

Se indujo la condrogénesis 2D basada en células *in vitro,* y se evaluó como se describe anteriormente en Johnson, K. et al. (2012) *Science* 336, 717. En resumen, las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humanas primarias (hMSCs) se aplicaron a un medio de crecimiento, y luego se cambiaron subsiguientemente a un medio de estimulación condrogénica con y sin las construcciones.

Para tomar la imagen inicial de la formación del nódulo, los pozos se fijaron y se tiñeron con Rodamina B, en donde los nódulos fueron fácilmente detectados visualmente, y se capturaron las imágenes mediante el microscopio de luz. Con el objeto de facilitar la detección y cuantificación basada en imágenes de alta producción, los nódulos condrogénicos se tiñeron con rojo del Nilo que se enlaza de una manera no específica a los colágenos. Los nódulos teñidos con rojo Nilo se cuantificaron en un Acumen eX3 (dispositivo de imágenes de un alto contenido) mediante excitación con un dispositivo de láser 488 para la rápida detección de los nódulos.

Tabla 3: Secuencias de la Familia de ANGPTL

SEQ ID	Construcción	Secuencia
71	**hANGPTL1 1-491**	MKTFTWTLGVLFFLLVDTGHCRGGQFKIKKINQRRYPRATD GKEEAKKCAYTFLVPEQRITGPICVNTKGQDASTIKDMITRM DLENLKDVLSRQKREIDVLQLVVDVDGNIVNEVKLLRKESRN MNSRVTQLYMQLLHEIIRKRDNSLELSQLENKILNVTTEMLK MATRYRELEVKYASLTDLVNNQSVMITLLEEQCLRIFSRQDT HVSPPLVQVVPQHIPNSQQYTPGLLGGNEIQRDPGYPRDL MPPPDLATSPTKSPFKIPPVTFINEGPFKDCQQAKEAGHSV SGIYMIKPENSNGPMQLWCENSLDPGGWTVIQKRTDGSVN FFRNWENYKKGFGNIDGEYWLGLENIYMLSNQDNYKLLIEL EDWSDKKVYAEYSSFRLEPESEFYRLRLGTYQGNAGDSMM WHNGKQFTTLDRDKDMYAGNCAHFHKGGWWYNACAHSN LNGVWYRGGHYRSKHQDGIFWAEYRGGSYSLRAVQMMIK PID
72	**CT hANGPTL1 271-491**	FINEGPFKDCQQAKEAGHSVSGIYMIKPENSNGPMQLWCE NSLDPGGWTVIQKRTDGSVNFFRNWENYKKGFGNIDGEY WLGLENIYMLSNQDNYKLLIELEDWSDKKVYAEYSSFRLEP ESEFYRLRLGTYQGNAGDSMMWHNGKQFTTLDRDKDMYA GNCAHFHKGGWWYNACAHSNLNGVWYRGGHYRSKHQD GIFWAEYRGGSYSLRAVQMMIKPID

SEQ ID	Construcción	Secuencia
73	**hANGPTL4 1-406**	MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDE MNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALERRLSACGSAC QGTEGSTDLPLAPESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFH KVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLDHEVAKPAR RKRLPEMAQPVDPAHNVSRLHRLPRDCQELFQVGERQSGL FEIQPQGSPPFLVNCKMTSDGGWTVIQRRHDGSVDFNRPW EAYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWD GNAELLQFSVHLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGL SVPFSTWDQDHDLRRDKNCAKSLSGGWWFGTCSHSNLNG QYFRSIPQQRQKLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAA EAAS
74	**CT hANGPTL4 179-406**	SRLHRLPRDCQELFQVGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNCKM TSDGGWTVIQRRHDGSVDFNRPWEAYKAGFGDPHGEFWL GLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGED TAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGLSVPFSTWDQDHDLRR DKNCAKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQKLKK GIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAAS

Tabla 4: Condrogénesis de proteínas miembros de la familia de ANGPTL

Proteína	Actividad de Formación de Nódulo	Inducción de colágeno tipo II	Acceso Genbank
Angptl1	Sí	Sí	NP_004664
Angptl2	No	n/a	NP_036230
Angptl3	Sí	Sí	NP_055310
Angptl4	Sí	No	NP_647475
Angptl6	No	No	NP_114123
Angptl7	No	No	NP_066969
Angpt2	No	n/a	NP_001138
Angpt1	No	n/a	NP_004664

Se indujo la condrogénesis 2D basada en células *in vitro,* y se evaluó como se describe anteriormente en Johnson, K. et al. (2012) *Science* 336, 717. Dicho de una manera breve, las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana primarias (hMSCs) se emplacaron en el medio de crecimiento, y entonces subsiguientemente se cambiaron hasta un medio de estimulación condrogénica con y sin las construcciones, y se cultivaron durante 7 o 14 días. Las células se fijaron entonces con formaldehído, se lavaron, y entonces se tiñeron utilizando técnicas inmuno-citoquímicas convencionales para detectar las proteínas de cartílago primarias Pro-colágeno Tipo 2A (PIIANP) (Figura 2A), y colágeno Tipo II (Figura 2B). Para la detección de colágeno tipo II, las células se digirieron con Colagenasa II al 0.2 % (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ), la cual se agregó a la solución de permeabilización. La inmunofluorescencia para cada proteína detectada se cuantificó a través de la toma de imágenes de alto contenido (Image Express Ultra (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)), utilizando el escrito de calificación de células de múltiples longitudes de onda, y como se describe anteriormente. Véase la Figura 2. La expresión de agrecano se monitoreó mediante la preparación de las células como sigue: Dicho de una manera breve, las hMSCs primarias (5,000 células) se emplacaron en una placa Greiner de 384 pozos. Después de 24 horas, se removió el medio de crecimiento y fue reemplazado con 25 microlitros de DMEM que contenía suero bovino fetal (FBS) al 1 %. Las construcciones de proteínas entonces se agregaron a cada pozo en las dosis indicadas, y los cultivos se hicieron crecer a 37°C durante 3 días. Las células se fijaron con formalina al 10 %, y se sometieron a los métodos inmunocitoquímicos para detectar la expresión de proteína de agrecano. Se tomaron las imágenes de los pozos en el ImageXpress Ultra, y se cuantificaron con el escrito de calificación de células de múltiples longitudes de onda, n = 6/concentración de proteína. Los resultados se ejemplifican en la Figura 3B en relación con el control (células estimuladas sin construcción, diluyente solo) para la ANGPTL3 C-terminal de tipo silvestre (WT) (225-460), la construcción diseñada 242KQ o 242Kdel, o la ANGPTL1 de longitud completa, un miembro de la familia relacionado de las proteínas de ANGPTL. Se vieron resultados similares con los experimentos utilizando cada una de las construcciones 225WT, 225KQ, 226KQ, 228KQ, 233KQ, 241KQ y 242KQ.

Se llevaron a cabo ensayos de condrogénesis utilizando los ensayos y métodos descritos anteriormente y en la presente para miembros adicionales de la familia relacionados con ANGPTL. Se llevaron a cabo experimentos para examinar si las proteínas estrechamente relacionadas conferían actividad condrogénica, y si la actividad era conservada en el extremo C-terminal de la proteína. ANGPTL1 y ANGPTL4 demostraron actividad en los ensayos de formación de nódulos; sin embargo, solamente ANGPTL1 mostró una inducción de colágeno tipo II en los ensayos de condrogénesis. Véase la Tabla 4. Los resultados de la actividad de formación de nódulos y de los ensayos de inducción de colágeno tipo II se resumen en la Tabla 4. La caracterización adicional de ANGPTL1 se describe en la presente. Véanse otras porciones de este Ejemplo y las Figuras 3 a 5.

Tabla 5: Homología de secuencias entre los miembros de la familia de tipo angiopoietina humana

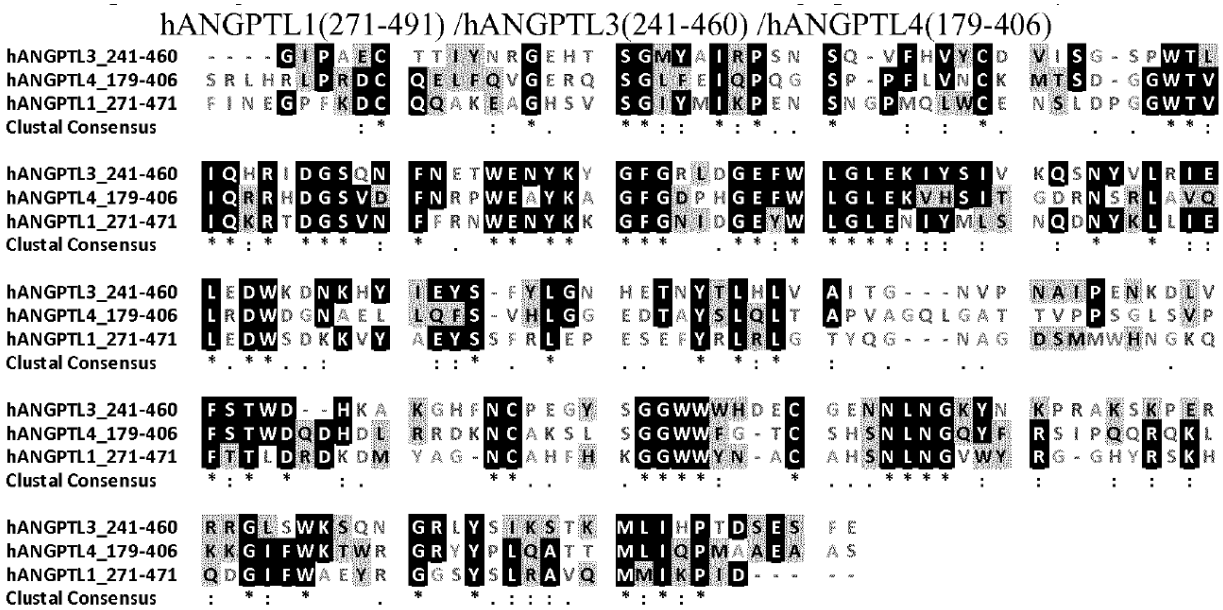
5A: Identidad de secuencias entre los miembros de la familia de tipo angiopoietina humana (ECD o CTD)

Miembro de la Familia	**Miembro de la Familia**	**% de Identidad de Secuencia**
hANGPTL3_17-460	hANGPTL4_26-406	32.6
hANGPTL3_17-460	hANGPTL1_24-491	25.7
hANGPTL3_17-460	hANGPTL7_27-346	28.1
hANGPTL3_17-460	hANGPT1_23-498	24.1
hANGPTL3_17-460	hANGPT2_19-496	23.4
hANGPTL3_241-460	hANGPTL4_179-406	40.0
hANGPTL3_241-460	hANGPTL1_271-491	36.8

Miembro de la Familia	Miembro de la Familia	% de Identidad de Secuencia
hANGPTL3_241-460	hANGPTL7_122-343	36.4
hANGPTL3_241-460	hANGPT1_277-497	37.3
hANGPTL3_241-460	hANGPT2_275-495	36.4

5B: Alineación de secuencias de los dominios C-terminales de los miembros de la familia de tipo angiopoietina humana

hANGPTL1(271-491) /hANGPTL3(241-460) /hANGPTL4(179-406)



También se utilizó el análisis de expresión del ARN para evaluar la expresión de las proteínas específicas de cartílago. Dicho de una manera breve, las hMSCs qRT-PCR se hicieron crecer en un cultivo de aglomerados (1 x 10^6 células/aglomerado) durante 3, 7, 10, 21 días en DMEM sin suero, como construcciones 1X ITS Plus (como se indican). El medio fue reemplazado cada 3 días. Se cuantificó la expresión del ARNm de lubricina, agrecano, Sox9, IGF1, IFITM1, Osteocalcina y colágeno tipo X, utilizando el Roche LightCiclor (los datos se reservaron a partir de 3 experimentos llevados a cabo por duplicado (n = 6)). La Figura 3A representa los datos de expresión en el día 10 para 242KQ y 225WT. Los datos de expresión genética fueron similares para todos los genes en los días 3, 7 y 21.

Anteriormente se había demostrado que la [0003] ANGPTL3 de longitud completa tenía actividad de condrogénesis en las células madre mesenquimales tanto humanas como de ratón. Las construcciones se probaron para determinar su actividad en las células madre mesenquimales humanas, de ratón, de rata y caninas, para demostrar la capacidad de reactividad cruzada con especies adicionales. Las CR-MSCs a partir de ratón, rata, humano y perro se cultivaron con las construcciones descritas anteriormente durante 18 días. Los cultivos se fijaron y se tiñeron empleando técnicas inmunocitoquímicas convencionales para detectar el colágeno tipo II de proteína específico de condrocitos, y se cuantificaron las células positivas para colágeno tipo II utilizando la toma de imágenes de alto contenido. Se confirmó un aumento de veces similar en la cantidad de colágeno tipo II cuantificado para cada especie de células evaluada.

Condroprotección. Se evaluaron las construcciones de péptidos en ensayos funcionales para evaluar la actividad condroprotectora.

Se llevó a cabo un ensayo de inhibición de la liberación de glucosaminoglucano (GAG) *in vivo* (un indicador del daño de la matriz) como se describe en Johnson, K. et al. (2012) *Science* 336, 717-721. Dicho de una manera breve, se aisló cartílago bovino, se perforó en círculos simétricos, y se puso en un cultivo de órgano. Las rebanadas se trataron durante 48 horas con 20 nanogramos/mililitro de TNFα y 10 nanogramos/mililitro de oncostatina M (OSM) (mediadores inflamatorios) con el objeto de inducir la degradación de la matriz de cartílago en la presencia o en ausencia de las construcciones de proteínas para identificar el porcentaje de inhibición de la liberación de glucosaminoglucano (GAG). Los resultados mostrados en la Figura 4A ilustran los datos reservados a partir de 4 donadores, n = 12, con las construcciones diseñadas como se indican, y WT 225-460.

Se llevó a cabo un ensayo de inhibición de óxido nítrico (NO) *in vitro* (un indicador de condroprotección) como se describe en Johnson, K. et al., (2012) *Science* 336, 717-721. Dicho de una manera breve, los condrocitos primarios se trataron durante 48 horas con las construcciones de proteínas como se indican. Se llevó a cabo la reacción de Greiss, para determinar el efecto de las construcciones sobre la inhibición de la liberación de NO, debido a que los resultados mostrados en la Figura 4B ilustran los resultados con las construcciones diseñadas como se indican, y el fragmento C-terminal de tipo silvestre (WT) 225-460. Los resultados mostrados en la Figura 4C ilustran los resultados con ANGPTL1 C-terminal de tipo silvestre, ANGPTL3 242KQ diseñada, o el control.

Inhibición de formación de cartílago fibrótico. Los condrocitos articulares humanos primarios se cultivaron como se describe anteriormente, con la adición del ácido ascórbico y la presencia o ausencia de las construcciones (indicadas) durante 14 días, con el objeto de inducir hipertrofia, y se evaluó la expresión de colágeno tipo X mediante inmunofluorescencia. Los resultados mostrados en la Figura 5A ilustran los datos con las construcciones 225WT o 242KQ como se indica. Los resultados mostrados en la Figura 5B ilustran los datos con ANGPTL1 C-terminal de tipo silvestre, ANGPTL3 242KQ o 242Kdel diseñadas, o el fragmento de ANGPTL3 C-terminal de tipo silvestre 225-460, como se indica. La presencia de las construcciones de tipo silvestre o activas confiere un efecto inhibidor sobre la formación de cartílago fibrótico bajo condiciones hipertróficas, como es detectado por la expresión de colágeno tipo X.

Angiogénesis. Se ha reportado que el dominio C-terminal de tipo silvestre (WT) de la proteína de ANGPTL3 tiene actividades y propiedades angiogénicas *in vitro* e *in vivo* en un modelo de córnea de rata. Véase Camenisch et al., J. Biol. Chem. 277(19): 17281-17290 (2002). Para resolver el posible riesgo de inducir nuevos vasos sanguíneos después de la administración *in vivo* de ANGPTL3 C-terminal, se examinaron los ensayos angiogénicos *in vitro*. Dicho de una manera breve, las células endoteliales de vena umbilical humana primarias (HUVECs) se agotaron de suero durante la noche con el medio celular endotelial basal. Las células entonces se marcaron con verde rastreador de células, y se agregaron a placas de matrigel previamente recubiertas empotradas con la construcción de proteína (indicada). Después del cultivo durante 18 horas en la presencia de ANGPTL3 de longitud completa (50 nanogramos/mililitro) o 242KQ (50 nanogramos/mililitro) o bFGF (50 nanogramos/mililitro), el cual se utilizó como un control positivo, se cuantificó el número de puntos de ramificación y la longitud total del tubo formada, utilizando toma de imágenes de alto contenido como una medida de la actividad angiogénica. En contraste con el efecto que se ve en la presencia de ANGPTL3 de longitud completa o del control positivo, no se detectó ningún incremento significativo en cualquier parámetro cuando las células se incubaron con 242KQ. Véase la Figura 2C.

Las CR-MSCs existen dentro del cartílago articular hialino e incrementan su número en respuesta a la lesión. Después de la lesión al tejido de cartílago, estas células tienen la capacidad para participar en los procesos de reparación, pero no conducen suficientemente a una reparación apropiada del cartílago por sí mismas. Los pacientes, por consiguiente, se dejan con el cartílago articular que carece de la capacidad apropiada para soportar los movimientos de la articulación sin dolor, y con frecuencia requieren de intervención quirúrgica y/o un reemplazo de la articulación para mantener su calidad de vida. Hemos encontrado que la ANGPTL3, y en particular los péptidos de ANGPTL3 resistentes a la proteasa diseñados, tienen la capacidad para dirigir la diferenciación de las CR-MSCs humanas hasta condrocitos, específicamente secretando el colágeno tipo II de proteínas de cartílago articular hialino y Sox9, mientras que se inhibe la formación de cartílago fibrótico observada por la expresión de colágeno tipo X.

No se ha reportado ninguna expresión de ANGPTL3 para nuestro conocimiento, ni se ha observado en nuestros estudios utilizando Western blot en condrocitos humanos, MSCs humanas, o fibroblastos sinoviales humanos. En las articulaciones de roedores, se encontró poca a ninguna expresión a través de la inmuno-histoquímica (IHC). Sin embargo, en el fluido sinovial osteoartrítico humano (n = 2), se detectó un bajo nivel de ANGPTL3 (de 1.3 a 6.0 nanogramos/mililitro) mediante el ensayo inmunosorbente enlazado a enzimas (ELISA), sugiriendo que, en una articulación comprometida, la proteína sistémicamente circulante puede entrar a la cavidad sinovial.

Ejemplo 4: Análisis in vivo de las construcciones

Modelo quirúrgico de lesión aguda de ratón. Se llevó a cabo la transección quirúrgica del ligamento cruciato anterior (ACL), el ligamento tibial meniscal medial (MMTL), y el ligamento colateral medial (MCL) de la rodilla derecha de ratones C57BL/6 (n = 12/grupo), con el fin de inducir inestabilidad en la articulación de la rodilla, y por consiguiente, para conducir a un fenotipo OA, adaptado del modelo previamente descrito en Glasson, S.S. et al., *Osteoarthritis Cartilage* 15, 1061 (2007). Con el fin de evaluar un beneficio terapéutico potencial del tratamiento con ANGPTL3, 15 semanas después de la cirugía, los ratones se dosificaron intra-articularmente, como se indica en la Figura 6A una vez por semana en las semanas 17 a 19: mANGPTL3 dosis = 200 nanogramos/rodilla. Se hicieron evaluaciones cuantitativas de la planicie tibial sobre una escala de 0 a 4, siendo 0 normal, y siendo 5 una severa osteoartritis (alteración del grosor completo del cartílago). Dos secciones de cada ratón fueron calificadas ciegamente por 2 observadores independientes (Figura 6B).

Se midió el alivio del dolor inducido por osteoartritis para los animales, mediante la prueba de incapacidad, o mediante la determinación del porcentaje de tiempo que el ratón se paraba en una pierna quirúrgicamente tratada contra la pierna no tratada, utilizando un dispositivo de monitoreo de incapacidad. La Figura 7 ilustra los resultados de las lecturas, que representan la respuesta al dolor en los días 35 y 56 después de la cirugía, y se reportaron como un porcentaje de carga de peso sobre la extremidad quirúrgica contra la extremidad no quirúrgica. El tratamiento ilustra los resultados de los animales dosificados como se describe anteriormente con la ANGPTL3 (WT17-460) de murino de longitud completa o la ANGPTL3 (WT225-460) humana C-terminal.

Modelo de OA crónica de ratón (inducida por colagenasa VII). Se utilizó otro modelo animal de osteoartritis ampliamente utilizado, el modelo de lesión de articulación crónica inducida por colagenasa VII, para evaluar la eficacia *in vivo* de las construcciones. El modelo y la evaluación se llevó a cabo como se describió anteriormente. Véase van der Kraan, P.M. et al., *Am. J. Pathol.* 135, 1001 (1989); y Johnson, K. et al., *Science* 336, 717 (2012). Dicho de una manera breve, un período de inflamación de tres (3) días es seguido por desestabilización de la articulación inducida por colagenasa, dando como resultado una destrucción del cartílago de leve a moderada. La administración intra-articular de las construcciones se llevó a cabo después de la inducción en la rodilla una vez por semana durante tres semanas, empezando 3 semanas después de la adición de colagenasa VII. Cuarenta y dos (42) días después del tratamiento, las articulaciones se recolectaron y se seccionaron. La calificación de la gravedad de la articulación histológica de la planicie femoral y tibial permitió hacer la cuantificación de la reparación del tejido. La gravedad de la calificación de la articulación se determinó a través de la calificació histológica como se describe anteriormente. La Figura 8 ilustra la reparación con las construcciones 225WT, 225KQ, 228KQ, 233KQ, y 241KQ. Para confirmar la presencia de proteína en la articulación (retención intra-articular a largo plazo), el tejido se fijó y se tiñó para determinar la presencia de la construcción de proteína de tipo silvestre (WT) a través de inmunohistoquímica. El análisis confirmó la presencia de proteína indicando la retención intra-articular de ANGPTL3 (sin verse efectos sobre los lípidos/triglicéridos, evaluados utilizando un panel metabólico estándar, no se muestran los datos).

El análisis histológico y la calificación sobre las secciones teñidas con Safranina O de la planicie tibial medial (para la detección de proteoglucano en el sitio de la lesión, como se describe anteriormente) reveló la regeneración en la matriz del cartílago (no se muestran los datos). El análisis cualñitativo confirmó el reemplazo de proteoglicanos similar a los niveles que se ven en un ratón sin tratamiento, mientras que los controles con vehículo no mostraron un reemplazo similar. Las secciones de tejido también se tiñeron como se describe anteriormente para colágeno tipo II, 8 semanas después de la inyección de la lesión. El análisis cualitativo confirmó un aumento de colágeno tipo II en las articulaciones tratadas con la construcción, de una manera similar a los niveles que se ven en un ratón sin tratamiento; mientras que los controles tratados con vehículo no mostraron un incremento similar (no se muestran los datos).

Modelo de desgarre meniscal de rata

También se utilizó un modelo de lesión quirúrgica de rata para evaluar la eficacia de las construcciones *in vivo*. El modelo y la evaluación se llevó a cabo inicialmente como se describió anteriormente en Gerwin N. et al., *Osteoarthritis Cartilage.* Suplemento 3: S24 (2010). Dicho de una manera breve, se rasuró la piel de una articulación de la rodilla, y se aisló el ligamento colateral medial (MCL) a través de una incisión, y el MCL se estabilizó, y se hizo un corte distal del menisco utilizando un escalpelo. En las semanas 1, 2 y 3 después de la cirugía, se inyectó la construcción de proteína o el control de vehículo intra-articularmente, y entonces las articulaciones se recolectaron y se seccionaron a las 4 y 6 semanas después de la cirugía. Se llevó a cabo la calificación de la gravedad de la articulación histológica de la planicie femoral y tibial para la cuantificación de la reparación del tejido como se describe anteriormente. Los datos se muestran para los análisis de 6 semanas.

El cartílago hialino saludable reemplazó el daño después del tratamiento. El análisis histológico y la calificación de la planicie tibial lateral del cartílago teñido con safranina O se llevaron a cabo como se describe anteriormente, y se cuantificó. Los resultados demostraron que los animales tratados con la construcción

242KQ revelaron la regeneración de la matriz de cartílago y el reemplazo de los proteoglucanos de una manera similar a los niveles que se ven en una rata sin tratamiento, mientras que los controles de vehículo no mostraron un reemplazo similar. Véase la Figura 9. Se vieron resultados similares con la 225WT.

Se utilizó un modelo de desgarre meniscal quirúrgicamente inducido ligeramente alterado de aquél descrito anteriormente, para iniciar el daño del cartílago en ratas Lewis machos, con el objeto de probar la eficacia de 242KQ para promover la reparación del cartílago *in vivo*. Se llevó a cabo la cirugía en las ratas para separar completamente el ligamento colateral medial y el menisco medial, con el fin de desestabilizar la articulación, de tal manera que el apoyo de peso futuro condujera a una rápida degeneración del cartílago. Se hizo una incisión para cortar el ligamento en ambos lados de la aguja, asegurando de esta manera un corte completo. Luego se utilizó una cuchilla de escalpelo para deslizarse debajo del ligamento patelar hasta el espacio sinovial, y se utilizó la punta afilada para cortar el menisco. Se llevó a cabo un corte exitoso cuando la articulación se dislocó lateralmente. Una semana después de la cirugía, las ratas se dosificaron mediante una inyección intra-articular de 242KQ o solución salina en un volumen de 25 microlitros en el espacio sinovial intra-articular.

Veintiocho días después de la cirugía de desgarre meniscal y veintiún días después de la inyección intra-articular de solución salina o de la construcción, los animales del estudio se sacrificaron, y se cosecharon las articulaciones afectadas para el análisis; se fijaron en formalina al 10 % en suero regulado con fosfato (PBS), se descalcificaron con ácido fórmico, y se empotraron en parafina antes de seccionarse. Las secciones coronales se cortaron y se tiñeron para Safranina O, o se dejaron sin teñir para el teñido inmunohistoquímico futuro. El análisis reveló que la planicie tibial medial tenía la mayor cantidad de daño del cartílago, y se decidió evaluar solamente esta área de la articulación para determinar la eficacia de la 242KQ. Utilizando el sistema de calificación OARSI, se asignaron calificaciones de gravedad del cartílago para seis secciones a través de la anchura del cartílago tibial para cada animal (N = 10) de una manera ciega. La calificación se hizo dos veces en diferentes puntos del tiempo, y luego las calificaciones se promediaron para crear una calificación de daño del cartílago. Adicionalmente, se llevaron a cabo análisis de calificación objetivos con un escrito a la medida generado en Matlab. El algoritmo identificó las superficies del cartílago articular, y cuantificó objetivamente los parámetros adicionales del cartílago (análisis zonales, intensidad de Safranina O, área del cartílago, grosor del cartílago). Los resultados se ilustran en la Figura 10A.

La reparación estructural del cartílago no siempre está asociada con el alivio del dolor, por lo menos en los seres humanos. Aunque la fisiología y la marcha del roedor son significativamente diferentes que en los seres humanos, la 242KQ se evaluó para determinar si había alguna mejora en la marcha o en el tiempo pasado sobre la extremidad quirúrgica después del tratamiento. Se llevó a cabo un monitoreo de incapacidad en las ratas tratadas con 242KQ. Las ratas se sometieron a la cirugía meniscal modificada, como se describe anteriormente. Una semana después de la cirugía, se inyectó la 242KQ en el espacio sinovial. En el día 28, las ratas se colocaron en un monitor de incapacidad sobre sus extremidades traseras, y se tomaron 30 lecturas subsiguientes durante 10 minutos para cada rata, con el fin de determinar el porcentaje de tiempo pasado (distribución del peso) sobre cada extremidad trasera. Estos datos dan una indicación de la redistribución de peso inducida por el dolor. Se determinó que, en el modelo de desgarre meniscal de rata, el tratamiento con 242KQ una semana después de la cirugía condujo a una restauración parcial de la capacidad de apoyo de peso igual de las ratas. Véase la Figura 10B.

Uno de los principales desafíos durante la reparación del cartílago espontánea o quirúrgica es el reemplazo del cartílago articular hialino con cartílago fibrótico. Para explorar el tipo de reparación del cartílago mediada por ANGPTL3, las secciones de las rodillas de rata recolectadas del estudio de desgarre meniscal de rata llevado a cabo anteriormente, se tiñeron para determinar la presencia de colágeno tipo II (para indicar el cartílago articular hialino) y de colágeno tipo X (para indicar el cartílago fibrótico). Después de una sola inyección de 20 microgramos de 242KQ, hubo una reducción cualitativa en la cantidad de expresión de colágeno tipo X.

Se determinó la retención a largo plazo de 242KQ después de la inyección intravenosa e intra-articular en las rodillas de rata, a través del marcado con ^{124}I de la proteína, y la administración fue seguida por la toma de imágenes de PET/µCT para monitorear la retención. Véase Gerwin, N. et al., (2006) *Advanced drug delivery reviews* 58, 226-242. El tiempo de residencia promedio (MRT) después de la inyección intra-articular (IA) de 242KQ en la articulación se determinó en aproximadamente 17.3 horas, el cual se incrementó significativamente sobre las 2 a 3 horas estándares reportadas (Véase la Tabla 6).

Tabla 6: Persistencia de ^{124}I 242KQ

Ruta	Dosis (µg)	C_{max} (mg/mL)	$AUC_{0\text{-}inf}$ (hr*µg/mL)	CL (mL/h)	Vss (mL)	MRT (h)	$T_{1/2}$ (h)
IV	164.2	129.3	22.1	7.4	53.4	7.2	12.4
IA	38.3	0.2	1.9	-	-	17.3	7.2

Modelo de lesión de articulación por menisectomía parcial de perro

También evaluamos la actividad de en un modelo de lesión de articulación de canino. El modelo se llevó a cabo, y las evaluaciones se realizaron, como se describe en Connor, J.R. et al., *Osteoarthritis and cartilage/OARS, Osteoarthritis Research Society* 17, 1236-1243 (2009). Dicho de una manera breve, se rasuró la piel de una articulación de rodilla, y se aisló el ligamento colateral medial (MCL) a través de una incisión, y el MCL se estabilizó y se hizo un corte distal del menisco utilizando un escalpelo. Cuatro (4) días después de la cirugía, los animales recibieron ya sea la dosificación dos veces por semana (1.5 microgramos o 15 microgramos), o bien una sola dosis (30 microgramos) de la construcción de proteína (ANGPTL3 canina de longitud completa) en el día 7, o el control de vehículo (inyectado intra-articularmente). Los perros se sacrificaron en el día 28, y las rodillas se sometieron al seccionamiento y calificación histológica como se describe anteriormente para los experimentos con rata y ratón. La Figura 10 ilustra la calificación general total de la reparación asociada con el tratamiento con ANGPTL3 canina. Después de la calificación y evaluación histológica de las secciones de articulación del perro teñidas con Safranina O, las áreas en donde tuvo lugar la pérdida de cartílago más grave en los grupos con solución salina estuvieron en la porción de la articulación que tuvieron la mayor reducción en el área de la lesión después de una sola dosis de 30 microgramos de cANGPTL3.

SECUENCIAS

SEQ ID	**Construcción**	**Secuencia**
1	**ANGPTL3 Humana**	MFTIKLLLFIVPLVISSRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLD DVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQS FYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSLELN SKLESLLEEKILLQQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEV TSLKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQQHSQIKEIEN QLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGI PAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSP WTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKI YSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTL HLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYS GGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWK SQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE

SEQ ID	Construcción	Secuencia
2	ANGPTL3 Humana REFSEQ	ttccagaagaaaacagttccacgttgcttgaaattgaaaatcaagataaaaatg ttcacaattaagctccttctttttattgttcctctagttatttcctccagaattgatcaaga caattcatcatttgattctctatctccagagccaaaatcaagatttgctatgttagac gatgtaaaaattttagccaatggcctccttcagttgggacatggtcttaaagacttt gtccataagacgaagggccaaattaatgacatatttcaaaaactcaacatatttg atcagtctttttatgatctatcgctgcaaaccagtgaaatcaaagaagaagaaa aggaactgagaagaactacatataaactacaagtcaaaaatgaagaggtaa agaatatgtcacttgaactcaactcaaaacttgaaagcctcctagaagaaaaa attctacttcaacaaaaagtgaaatatttagaagagcaactaactaacttaattc aaaatcaacctgaaactccagaacacccagaagtaacttcacttaaaacttttg tagaaaaacaagataatagcatcaaagaccttctccagaccgtggaagacca atataaacaattaaaccaacagcatagtcaaataaaagaaatagaaaatcag ctcagaaggactagtattcaagaacccacagaaatttctctatcttccaagccaa gagcaccaagaactactccctttcttcagttgaatgaaataagaaatgtaaaac atgatggcattcctgctgaatgtaccaccatttataacagaggtgaacatacaag tggcatgtatgccatcagacccagcaactctcaagtttttcatgtctactgtgatgtt atatcaggtagtccatggacattaattcaacatcgaatagatggatcacaaaact tcaatgaaacgtgggagaactacaaatatggttttgggaggcttgatggagaatt ttggttgggcctagagaagatatactccatagtgaagcaatctaattatgttttacg aattgagttggaagactggaaagacaacaaacattatattgaatattctttttactt gggaaatcacgaaaccaactatacgctacatctagttgcgattactggcaatgt ccccaatgcaatcccggaaaacaaagatttggtgttttctacttgggatcacaaa gcaaaaggacacttcaactgtccagagggttattcaggaggctggtggtggcat gatgagtgtggagaaaacaacctaaatggtaaatataacaaaccaagagca aaatctaagccagagaggagaagaggattatcttggaagtctcaaaatggaa ggttatactctataaaatcaaccaaaatgttgatccatccaacagattcagaaag ctttgaatgaactgaggcaaatttaaaaggcaataatttaaacattaacctcattc caagttaatgtggtctaataatctggtattaaatccttaagagaaagcttgagaaa tagatttttttatcttaaagtcactgtctatttaagattaaacatacaatcacataacc ttaaagaataccgtttacatttctcaatcaaaattcttataatactatttgttttaaatttt gtgatgtgggaatcaattttagatggtcacaatctagattataatcaataggtgaa cttattaaataacttttctaaataaaaaatttagagacttttattttaaaaggcatcat atgagctaatatcacaactttcccagtttaaaaaactagtactcttgttaaaactct aaacttgactaaatacagaggactggtaattgtacagttcttaaatgttgtagtatt aatttcaaaactaaaaatcgtcagcacagagtatgtgtaaaaatctgtaataca aatttttaaactgatgcttcattttgctacaaaataatttggagtaaatgtttgatatga tttatttatgaaacctaatgaagcagaattaaatactgtattaaaataagttcgctgt ctttaaacaaatggagatgactactaagtcacattgactttaacatgaggtatcac tataccttatt
3	ANGPTL3 de Murino	MHTIKLFLFVVPLVIASRVDPDLSSFDSAPSEPKSRFAML DDVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQ SFYDLSLRTNEIKEEEKELRRTTSTLQVKNEEVKNMSVEL NSKLESLLEEKTALQHKVRALEEQLTNLILSPAGAQEHPE VTSLKSFVEQQDNSIRELLQSVEEQYKQLSQQHMQIKEI EKQLRKTGIQEPSENSLSSKSRAPRTTPPLQLNETENTE QDDLPADCSAVYNRGEHTSGVYTIKPRNSQGFNVYCDT QSGSPWTLIQHRKDGSQDFNETWENYEKGFGRLDGEF WLGLEKIYAIVQQSNYILRLELQDWKDSKHYVEYSFHLG SHETNYTLHVAEIAGNIPGALPEHTDLMFSTWNHRAKGQ LYCPESYSGGWWWNDICGENNLNGKYNKPRTKSRPER RRGIYWRPQSRKLYAIKSSKMMLQPTT

SEQ ID	Construcción	Secuencia
4	ANGPTL3 Canina	MYTIKLFLFIIPLVISSKIDRDYSSYDSVSPEPKSRFAMLDD VKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFY DLSLQTNEIKEEEKELRRTTSKLQVKNEEVKNMSLELNS KVESLLEEKILLQQKVRYLEKQLTSLIKNQPEIQEHPEVTS LKTFVEQQDNSIKDLLQTVEEQYRQLNQQHSQIKEIENQL RNVIQESTENSLSSKPRAPRTTPFLHLNETKNVEHNDIPA NCTTIYNRGEHTSGIYSIRPSNSQVFNVYCDVKSGSSWT LIQHRIDGSQNFNETWENYRYGFGRLDGEFWLGLEKIYS IVKQSNYILRIELEDWNDNKHYIEYFFHLGNHETNYTLHLV EITGNILNALPEHKDLVFSTWDHKAKGHVNCPESYSGG WWWHNVCGENNLNGKYNKQRAKTKPERRRGLYWKSQ NGRLYSIKSTKMLIHPIDSESSE
5	ANGPTL3 Equina	MYTIKLFLVIAPLVISSRIDQDYSSLDSIPPEPKSRFAMLDD VKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFY ALSLQTNEIKEEEKELRRTTSKLQVKNEEVKNMSLELNSK LESLLEEKSLLQQKVKYLEEQLTKLIKNQPEIQEHPEVTSL KTFVEQQDNSIKDLLQTMEEQYRQLNQQHSQIKEIENQL RRTGIQESTENSLSSKPRAPRTTPSFHLNETKDVEHDDF PADCTTIYNRGEHTSGIYSIKPSNSQVFNVYCDVISGSSW ILIQRRIDGSQNFNETWQNYKYGFGRLDFEFWLGLEKIYS IVKRSNYILRIELEDWKDNKHTIEYSFHLGNHETNYTLHLV EITGNVPNALPEHKDLVFSTWDHKAKGQLNCLESYSGG WWWHDVCGGDNPNGKYNKPRSKTKPERRRGICWKSQ NGRLYTIKSTKMLIHPIDSESFELRQIKKPMN
6	ANGPTL3 Bovina	MYTIKLFLIIAPLVISSRTDQDYTSLDSISPEPKSRFAMLDD VKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFY DLSLQTNEIKEEEKELRRATASKLQVKNEEVKNMSLELD SKLESLLEEKILLQQKVRYLEDQLTDLIKNQPQIQEYLEVT SLKTLVEQQDNSIKDLLQIVEEQYRQLNQQQSQIKEIENQ LRRTGIKESTEISLSSKPRAPRTTPSFHSNETKNVEHDDI PADCTIIYNQGKHTSGIYSIRPSNSQVFNVYCDVKSGSS WTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKI YSIVMQSNYILRIELEDWKDKYYTEYSFHLGDHETNYTLH LAEISGNGPKAFPEHKDLMFSTWDHKAKGHFNCPESNS GGWWYHDVCGENNLNGKYNKPKAKAKPERKEGICWKS QDGRLYSIKATKMLIHPSDSENSE
7	207-455WT	IQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTI YNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHR IDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQS NYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITG NVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWW HDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRL YSIKSTKMLIHPTD
8	225-455WT	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRP SNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYK YGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNK HYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

SEQ ID	Construcción	Secuencia
9	228-455WT	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNS QVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGF GRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIE YSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDH KAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRA KSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
10	233-455WT	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHV YCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFY LGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSK PERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
11	241-455WT	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLE KIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNY TLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLS WKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
12	ANGPTL3KQ	MFTIKLLLFIVPLVISSRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLD DVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQS FYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSLELN SKLESLLEEKILLQQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEV TSLKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQQHSQIKEIEN QLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGI PAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSP WTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKI YSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTL HLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYS GGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWK SQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
13	ANGPTL3KS	MFTIKLLLFIVPLVISSRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLD DVKILANGLLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQS FYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSLELN SKLESLLEEKILLQQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEV TSLKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQQHSQIKEIEN QLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGI PAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSP WTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKI YSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTL HLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYS GGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWK SQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE

SEQ ID	Construcción	Secuencia
14	207KQ	IQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTI YNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHR IDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQS NYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITG NVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWW HDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRL YSIKSTKMLIHPTDSESFE
15	207KS	IQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTI YNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHR IDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQS NYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITG NVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWW HDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRL YSIKSTKMLIHPTDSESFE
16	225KQ	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRP SNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYK YGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNK HYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSE SFE
17	225KS	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRP SNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYK YGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNK HYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSE SFE
18	225ST	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRP SNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYK YGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNK HYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRAKTKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSE SFE
19	226KQ	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPS NSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKY GFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKH YIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSE SFE
20	226KS	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPS NSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKY GFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKH YIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSE SFE

SEQ ID	Construcción	Secuencia
21	228KQ	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNS QVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGF GRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIE YSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDH KAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRA QSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
22	228KS	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNS QVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGF GRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIE YSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDH KAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRA SSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
23	228ST	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNS QVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGF GRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIE YSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDH KAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRA KTKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
24	233KQ	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHV YCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFY LGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSK PERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
25	233KS	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHV YCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFY LGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSK PERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
26	241KQ	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLE KIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNY TLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLS WKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
27	241KS	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLE KIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNY TLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLS WKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE

SEQ ID	Construcción	Secuencia
28	242KQ	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSP WTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKI YSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTL HLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYS GGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWK SQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
29	242KS	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSP WTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKI YSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTL HLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYS GGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWK SQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
30	225-455KQ	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRP SNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYK YGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNK HYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
31	225-455KS	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRP SNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYK YGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNK HYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
32	226-455KQ	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPS NSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKY GFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKH YIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
33	226-455KS	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPS NSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKY GFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKH YIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
34	228-455KQ	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNS QVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGF GRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIE YSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDH KAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRA QSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

SEQ ID	Construcción	Secuencia
35	228-455KS	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNS QVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGF GRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIE YSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDH KAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRA SSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
36	233-455KQ	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHV YCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFY LGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSK PERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
37	233-455KS	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHV YCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFY LGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSK PERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
38	241-455KQ	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLE KIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNY TLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLS WKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
39	241-455KS	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLE KIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNY TLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLS WKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
40	242-455KQ	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSP WTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKI YSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTL HLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYS GGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWK SQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
41	242-455KS	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSP WTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKI YSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTL HLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYS GGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWK SQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

SEQ ID	Construcción	Secuencia
42	227KQ Canina	FLHLNETKNVEHNDIPANCTTIYNRGEHTSGIYSIRPSNS QVFNVYCDVKSGSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENYRYG FGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYILRIELEDWNDNKHYI EYFFHLGNHETNYTLHLVEITGNILNALPEHKDLVFSTWD HKAKGHVNCPESYSGGWWWHNVCGENNLNGKYNKQR AQTKPERRRGLYWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPIDSESSE
43	227KS Canina	FLHLNETKNVEHNDIPANCTTIYNRGEHTSGIYSIRPSNS QVFNVYCDVKSGSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENYRYG FGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYILRIELEDWNDNKHYI EYFFHLGNHETNYTLHLVEITGNILNALPEHKDLVFSTWD HKAKGHVNCPESYSGGWWWHNVCGENNLNGKYNKQR ASTKPERRRGLYWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPIDSESSE
44	Secuencia de ácido nucleico 225WT	ACTACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGT AAAACATGATGGCATTCCTGCTGAATGTACCACCATTT ATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCAT CAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTG ATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACAT CGAATAGATGGATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGG AGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGA ATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGA AGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGAC TGGAAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTAC TTGGGAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGT TGCGATTACTGGCAATGTCCCCAATGCAATCCCGGAA AACAAAGATTTGGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAAGC AAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGA GGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAAC CTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCAAAATCTAA GCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAGTCTCAA AATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAAATGTT GATCCATCCAACAGATTCAGAAAGCTTTGAA
45	Secuencia de ácido nucleico 225KQ	ACTACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGT AAAACATGATGGCATTCCTGCTGAATGTACCACCATTT ATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCAT CAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTG ATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACAT CGAATAGATGGATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGG AGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGA ATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGA AGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGAC TGGAAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTAC TTGGGAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGT TGCGATTACTGGCAATGTCCCCAATGCAATCCCGGAA AACAAAGATTTGGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAAGC AAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGA GGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAAC CTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCACAATCTAA GCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAGTCTCAA AATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAAATGTT GATCCATCCAACAGATTCAGAAAGCTTTGAA

SEQ ID	Construcción	Secuencia
46	Secuencia de ácido nucleico 225KS	ACTACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGT AAAACATGATGGCATTCCTGCTGAATGTACCACCATTT ATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCAT CAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTG ATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACAT CGAATAGATGGATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGG AGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGA ATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGA AGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGAC TGGAAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTAC TTGGGAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGT TGCGATTACTGGCAATGTCCCCAATGCAATCCCGGAA AACAAAGATTTGGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAAGC AAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGA GGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAAC CTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCAAGCTCTAA GCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAGTCTCAA AATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAAATGTT GATCCATCCAACAGATTCAGAAAGCTTTGAA
47	Secuencia de ácido nucleico 226KQ	ACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAA ACATGATGGCATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATA ACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAG ACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATG TTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGA ATAGATGGATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGA ACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTT TGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGC AATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGG AAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTG GGAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGC GATTACTGGCAATGTCCCCAATGCAATCCCGGAAAAC AAAGATTTGGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAAGCAAA AGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGC TGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAA ATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCACAATCTAAGCCA GAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAGTCTCAAAATG GAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAAATGTTGATC CATCCAACAGATTCAGAAAGCTTTGAA
48	Secuencia de ácido nucleico 226KS	ACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAA ACATGATGGCATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATA ACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAG ACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATG TTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGA ATAGATGGATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGA ACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTT TGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGC AATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGG AAAGACAACAAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTG GGAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGC GATTACTGGCAATGTCCCCAATGCAATCCCGGAAAAC AAAGATTTGGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAAGCAAA AGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGC TGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAA ATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCAAGCTCTAAGCCA GAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAGTCTCAAAATG GAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAAATGTTGATC CATCCAACAGATTCAGAAAGCTTTGAA

SEQ ID	Construcción	Secuencia
49	Secuencia de ácido nucleico 228KQ	TTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGAT GGCATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGG TGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACCCAGC AACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCA GGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGG ATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAAT ATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGG CCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATT ATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAAC AAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCAC GAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGG CAATGTCCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAAGATTTG GTGTTTTCTACTTGGGATCACAAAGCAAAAGGACACTT CAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGG CATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATA TAACAAACCAAGAGCACAATCTAAGCCAGAGAGGAGA AGAGGATTATCTTGGAAGTCTCAAAATGGAAGGTTATA CTCTATAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAG ATTCAGAAAGCTTTGAA
50	Secuencia de ácido nucleico 228KS	TTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGAT GGCATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGG TGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACCCAGC AACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCA GGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGG ATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAAT ATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGG CCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATT ATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAAC AAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCAC GAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGG CAATGTCCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAAGATTTG GTGTTTTCTACTTGGGATCACAAAGCAAAAGGACACTT CAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGG CATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATA TAACAAACCAAGAGCAAGCTCTAAGCCAGAGAGGAGA AGAGGATTATCTTGGAAGTCTCAAAATGGAAGGTTATA CTCTATAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAG ATTCAGAAAGCTTTGAA

SEQ ID	Construcción	Secuencia
51	Secuencia de ácido nucleico 233KQ	GAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCCTGCTGA ATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTG GCATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTT CATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGAC ATTAATTCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACTTCA ATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAG GCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATA TACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATT GAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAAACATTATATTGA ATATTCTTTTTACTTGGGAAATCACGAAACCAACTATAC GCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCCAATG CAATCCCGGAAAACAAAGATTTGGTGTTTTCTACTTGG GATCACAAAGCAAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGG GTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGG AGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAG CACAATCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTG GAAGTCTCAAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAA CCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTCAGAAAGCTTT GAA
52	Secuencia de ácido nucleico 233KS	GAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCCTGCTGA ATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTG GCATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTT CATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGAC ATTAATTCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACTTCA ATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAG GCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATA TACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATT GAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAAACATTATATTGA ATATTCTTTTTACTTGGGAAATCACGAAACCAACTATAC GCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCCAATG CAATCCCGGAAAACAAAGATTTGGTGTTTTCTACTTGG GATCACAAAGCAAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGG GTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGG AGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAG CAAGCTCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTG GAAGTCTCAAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAA CCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTCAGAAAGCTTT GAA
53	Secuencia de ácido nucleico 241KQ	GGCATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGG TGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACCCAGC AACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCA GGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGG ATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAAT ATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGG CCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATT ATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAAC AAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCAC GAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGG CAATGTCCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAAGATTTG GTGTTTTCTACTTGGGATCACAAAGCAAAAGGACACTT CAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGG CATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATA TAACAAACCAAGAGCACAATCTAAGCCAGAGAGGAGA AGAGGATTATCTTGGAAGTCTCAAAATGGAAGGTTATA CTCTATAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAG ATTCAGAAAGCTTTGAA

SEQ ID	Construcción	Secuencia
54	Secuencia de ácido nucleico 241KS	GGCATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGG TGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACCCAGC AACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCA GGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGG ATCACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAAT ATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGG CCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATT ATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAAC AAACATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCAC GAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGG CAATGTCCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAAGATTTG GTGTTTTCTACTTGGGATCACAAAGCAAAAGGACACTT CAACTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGG CATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATA TAACAAACCAAGAGCAAGCTCTAAGCCAGAGAGGAGA AGAGGATTATCTTGGAAGTCTCAAAATGGAAGGTTATA CTCTATAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAG ATTCAGAAAGCTTTGAA
55	Secuencia de ácido nucleico 242KQ	ATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGA ACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACCCAGCAAC TCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGT AGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGGATC ACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATG GTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCT AGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATG TTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAAA CATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCACGAA ACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAA TGTCCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAAGATTTGGTG TTTTCTACTTGGGATCACAAAGCAAAAGGACACTTCAA CTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCAT GATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAA CAAACCAAGAGCACAATCTAAGCCAGAGAGGAGAAGA GGATTATCTTGGAAGTCTCAAAATGGAAGGTTATACTC TATAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATT CAGAAAGCTTTGAA
56	Secuencia de ácido nucleico 242KS	ATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGA ACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACCCAGCAAC TCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGT AGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGGATC ACAAAACTTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATG GTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCT AGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATG TTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAAA CATTATATTGAATATTCTTTTTACTTGGGAAATCACGAA ACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAA TGTCCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAAGATTTGGTG TTTTCTACTTGGGATCACAAAGCAAAAGGACACTTCAA CTGTCCAGAGGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCAT GATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAA CAAACCAAGAGCAAGCTCTAAGCCAGAGAGGAGAAGA GGATTATCTTGGAAGTCTCAAAATGGAAGGTTATACTC TATAAAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATT CAGAAAGCTTTGAA

SEQ ID	Construcción	Secuencia
57	Secuencia de ácido nucleico c227KQ	TTTTTGCATCTCAACGAAACGAAGAATGTCGAACACAA CGACATTCCGGCAAATTGCACAACTATCTACAATAGAG GCGAACATACGTCCGGTATCTACTCCATTAGACCTTCA AACAGCCAGGTATTCAATGTGTACTGCGATGTAAAGTC AGGATCGTCATGGACACTGATCCAGCATAGGATCGAC GGGTCCCAGAACTTCAACGAGACATGGGAGAACTACC GCTATGGATTTGGAAGGCTGGATGGGGAGTTCTGGTT GGGACTTGAGAAAATCTACAGCATTGTGAAGCAGTCG AACTACATTCTCCGGATTGAACTGGAGGACTGGAATG ACAACAAACACTACATCGAGTATTTCTTTCATCTCGGC AACCATGAAACGAATTACACCTTGCACCTTGTGGAAAT CACGGGCAACATTTTGAACGCGCTGCCAGAACACAAA GACCTGGTGTTTTCGACATGGGATCACAAAGCAAAGG GGCACGTGAACTGTCCCGAATCATATAGCGGGGGATG GTGGTGGCACAATGTCTGTGGTGAGAACAATCTCAAC GGGAAATACAATAAGCAGCGAGCTCAGACGAAACCCG AGCGGCGGAGAGGTCTGTATTGGAAGTCGCAGAATG GACGCCTGTATTCGATCAAATCGACGAAAATGCTCATC CACCCCATCGACTCCGAATCGTCGGAG
58	207Kdel	IQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTI YNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHR IDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQS NYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITG NVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWW HDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLY SIKSTKMLIHPTDSESFE
59	225Kdel	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRP SNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYK YGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNK HYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSES FE
60	226Kdel	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPS NSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKY GFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKH YIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSES FE
61	228Kdel	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNS QVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGF GRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIE YSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDH KAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRA SKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE

SEQ ID	Construcción	Secuencia
62	233Kdel	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHV YCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFY LGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKP ERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
63	241Kdel	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLE KIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNY TLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSW KSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
64	242Kdel	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSP WTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKI YSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTL HLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYS GGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKS QNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
65	225-455Kdel	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRP SNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYK YGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNK HYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
66	226-455Kdel	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPS NSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKY GFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKH YIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFST WDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN KPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
67	228-455Kdel	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNS QVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGF GRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIE YSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDH KAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRA SKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
68	233-455Kdel	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHV YCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLD GEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFY LGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKP ERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

SEQ ID	Construcción	Secuencia
69	241-455Kdel	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLE KIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNY TLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSW KSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
70	242-455Kdel	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSP WTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKI YSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTL HLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYS GGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKS QNGRLYSIKSTKMLIHPTD
71	hANGPTL1 1-491	MKTFTWTLGVLFFLLVDTGHCRGGQFKIKKINQRRYPRA TDGKEEAKKCAYTFLVPEQRITGPICVNTKGQDASTIKDM ITRMDLENLKDVLSRQKREIDVLQLVVDVDGNIVNEVKLL RKESRNMNSRVTQLYMQLLHEIIRKRDNSLELSQLENKIL NVTTEMLKMATRYRELEVKYASLTDLVNNQSVMITLLEE QCLRIFSRQDTHVSPPLVQVVPQHIPNSQQYTPGLLGGN EIQRDPGYPRDLMPPPDLATSPTKSPFKIPPVTFINEGPF KDCQQAKEAGHSVSGIYMIKPENSNGPMQLWCENSLDP GGWTVIQKRTDGSVNFFRNWENYKKGFGNIDGEYWLG LENIYMLSNQDNYKLLIELEDWSDKKVYAEYSSFRLEPES EFYRLRLGTYQGNAGDSMMWHNGKQFTTLDRDKDMYA GNCAHFHKGGWWYNACAHSNLNGVWYRGGHYRSKHQ DGIFWAEYRGGSYSLRAVQMMIKPID
72	CT hANGPTL1 271-491	FINEGPFKDCQQAKEAGHSVSGIYMIKPENSNGPMQLW CENSLDPGGWTVIQKRTDGSVNFFRNWENYKKGFGNID GEYWLGLENIYMLSNQDNYKLLIELEDWSDKKVYAEYSS FRLEPESEFYRLRLGTYQGNAGDSMMWHNGKQFTTLD RDKDMYAGNCAHFHKGGWWYNACAHSNLNGVWYRG GHYRSKHQDGIFWAEYRGGSYSLRAVQMMIKPID
73	hANGPTL4 1-406	MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASW DEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALERRLSAC GSACQGTEGSTDLPLAPESRVDPEVLHSLQTQLKAQNS RIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLD HEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRLHRLPRDCQEL FQVGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNCKMTSDGGWTVIQR RHDGSVDFNRPWEAYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSIT GDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGEDTAYSLQL TAPVAGQLGATTVPPSGLSVPFSTWDQDHDLRRDKNCA KSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQKLKKGIFW KTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAAS
74	CT hANGPTL4 179-406	SRLHRLPRDCQELFQVGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNC KMTSDGGWTVIQRRHDGSVDFNRPWEAYKAGFGDPHG EFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSV HLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGLSVPFSTW DQDHDLRRDKNCAKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFRS IPQQRQKLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAA S

Listado de secuencias

<110> JOHNSON, Kristen SHI, Jian

<120> PÉPTIDOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE DAÑOS DE LAS ARTICULACIONES

<130> PAT055625

<150> 61/775400

<151> 2013-03-08

<150> 61/938123

<151> 2014-02-10

<160> 74

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 460

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu Leu Phe Ile Val Pro Leu Val Ile Ser
1               5                   10                  15

Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu
            20                  25                  30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
        35                  40                  45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
    50                  55                  60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
65                  70                  75                  80

Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu
                85                  90                  95

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
            100                 105                 110

Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
        115                 120                 125

Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
    130                 135                 140
```

Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu
145 150 155 160

Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys
165 170 175

Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln
180 185 190

His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile
195 200 205

Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
210 215 220

Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
225 230 235 240

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
245 250 255

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
260 265 270

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
275 280 285

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
290 295 300

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
305 310 315 320

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
325 330 335

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
340 345 350

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
355 360 365

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
370 375 380

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
385 390 395 400

```
Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
                405                 410                 415

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
            420                 425                 430

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
        435                 440                 445

Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
    450                 455                 460
```

<210> 2

<211> 2126

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
ttccagaaga aaacagttcc acgttgcttg aaattgaaaa tcaagataaa aatgttcaca       60
attaagctcc ttctttttat tgttcctcta gttatttcct ccagaattga tcaagacaat      120
tcatcatttg attctctatc tccagagcca aaatcaagat ttgctatgtt agacgatgta      180
aaaattttag ccaatggcct ccttcagttg ggacatggtc ttaaagactt tgtccataag      240
acgaagggcc aaattaatga catatttcaa aaactcaaca tatttgatca gtctttttat      300
gatctatcgc tgcaaaccag tgaaatcaaa gaagaagaaa aggaactgag aagaactaca      360
tataaactac aagtcaaaaa tgaagaggta aagaatatgt cacttgaact caactcaaaa      420
cttgaaagcc tcctagaaga aaaaattcta cttcaacaaa aagtgaaata tttagaagag      480
caactaacta acttaattca aaatcaacct gaaactccag aacacccaga agtaacttca      540
cttaaaactt ttgtagaaaa acaagataat agcatcaaag accttctcca gaccgtggaa      600
gaccaatata aacaattaaa ccaacagcat agtcaaataa aagaaataga aaatcagctc      660
agaaggacta gtattcaaga acccacagaa atttctctat cttccaagcc aagagcacca      720
agaactactc cctttcttca gttgaatgaa ataagaaatg taaaacatga tggcattcct      780
gctgaatgta ccaccattta taacagaggt gaacatacaa gtggcatgta tgccatcaga      840
cccagcaact ctcaagtttt tcatgtctac tgtgatgtta tatcaggtag tccatggaca      900
ttaattcaac atcgaataga tggatcacaa aacttcaatg aaacgtggga gaactacaaa      960
tatggttttg ggaggcttga tggagaattt tggttgggcc tagagaagat atactccata     1020
gtgaagcaat ctaattatgt tttacgaatt gagttggaag actggaaaga caacaaacat     1080
tatattgaat attcttttta cttgggaaat cacgaaacca actatacgct acatctagtt     1140
```

```
gcgattactg gcaatgtccc caatgcaatc ccggaaaaca aagatttggt gttttctact     1200
tgggatcaca aagcaaaagg acacttcaac tgtccagagg gttattcagg aggctggtgg     1260
tggcatgatg agtgtggaga aaacaaccta aatggtaaat ataacaaacc aagagcaaaa     1320
tctaagccag agaggagaag aggattatct tggaagtctc aaaatggaag gttatactct     1380
ataaaatcaa ccaaaatgtt gatccatcca acagattcag aaagctttga atgaactgag     1440
gcaaatttaa aaggcaataa tttaaacatt aacctcattc caagttaatg tggtctaata     1500
atctggtatt aaatccttaa gagaaagctt gagaaataga tttttttat cttaaagtca     1560
ctgtctattt aagattaaac atacaatcac ataaccttaa agaataccgt ttacatttct     1620
caatcaaaat tcttataata ctatttgttt taaattttgt gatgtgggaa tcaattttag     1680
atggtcacaa tctagattat aatcaatagg tgaacttatt aaataacttt tctaaataaa     1740
aaatttagag acttttattt taaaaggcat catatgagct aatatcacaa ctttcccagt     1800
ttaaaaaact agtactcttg ttaaaactct aaacttgact aaatacagag gactggtaat     1860
tgtacagttc ttaaatgttg tagtattaat ttcaaaacta aaaatcgtca gcacagagta     1920
tgtgtaaaaa tctgtaatac aaatttttaa actgatgctt cattttgcta caaaataatt     1980
tggagtaaat gtttgatatg atttatttat gaaacctaat gaagcagaat taaatactgt     2040
attaaaataa gttcgctgtc tttaaacaaa tggagatgac tactaagtca cattgacttt     2100
aacatgaggt atcactatac cttatt                                          2126
```

<210> 3

<211> 455

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

```
Met His Thr Ile Lys Leu Phe Leu Phe Val Val Pro Leu Val Ile Ala
1               5                   10                  15

Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Pro Ser Glu
            20                  25                  30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
        35                  40                  45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
    50                  55                  60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
65                  70                  75                  80
```

Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn Glu Ile Lys Glu Glu Glu
85 90 95

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
100 105 110

Val Lys Asn Met Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
115 120 125

Glu Glu Lys Thr Ala Leu Gln His Lys Val Arg Ala Leu Glu Glu Gln
130 135 140

Leu Thr Asn Leu Ile Leu Ser Pro Ala Gly Ala Gln Glu His Pro Glu
145 150 155 160

Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ile Arg
165 170 175

Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu Ser Gln Gln
180 185 190

His Met Gln Ile Lys Glu Ile Glu Lys Gln Leu Arg Lys Thr Gly Ile
195 200 205

Gln Glu Pro Ser Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ser Arg Ala Pro Arg
210 215 220

Thr Thr Pro Pro Leu Gln Leu Asn Glu Thr Glu Asn Thr Glu Gln Asp
225 230 235 240

Asp Leu Pro Ala Asp Cys Ser Ala Val Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
245 250 255

Ser Gly Val Tyr Thr Ile Lys Pro Arg Asn Ser Gln Gly Phe Asn Val
260 265 270

Tyr Cys Asp Thr Gln Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
275 280 285

Lys Asp Gly Ser Gln Asp Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Glu Lys
290 295 300

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
305 310 315 320

Tyr Ala Ile Val Gln Gln Ser Asn Tyr Ile Leu Arg Leu Glu Leu Gln
325 330 335

Asp Trp Lys Asp Ser Lys His Tyr Val Glu Tyr Ser Phe His Leu Gly
340 345 350

Ser His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Val Ala Glu Ile Ala Gly Asn
355 360 365

Ile Pro Gly Ala Leu Pro Glu His Thr Asp Leu Met Phe Ser Thr Trp
370 375 380

Asn His Arg Ala Lys Gly Gln Leu Tyr Cys Pro Glu Ser Tyr Ser Gly
385 390 395 400

Gly Trp Trp Trp Asn Asp Ile Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
405 410 415

Tyr Asn Lys Pro Arg Thr Lys Ser Arg Pro Glu Arg Arg Arg Gly Ile
420 425 430

Tyr Trp Arg Pro Gln Ser Arg Lys Leu Tyr Ala Ile Lys Ser Ser Lys
435 440 445

Met Met Leu Gln Pro Thr Thr
450 455

<210> 4

<211> 459

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 4

Met Tyr Thr Ile Lys Leu Phe Leu Phe Ile Ile Pro Leu Val Ile Ser
1 5 10 15

Ser Lys Ile Asp Arg Asp Tyr Ser Ser Tyr Asp Ser Val Ser Pro Glu
20 25 30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
35 40 45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
50 55 60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Asn Glu Ile Lys Glu Glu Glu

85 90 95

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
100 105 110

Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Val Glu Ser Leu Leu
115 120 125

Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Arg Tyr Leu Glu Lys Gln
130 135 140

Leu Thr Ser Leu Ile Lys Asn Gln Pro Glu Ile Gln Glu His Pro Glu
145 150 155 160

Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ile Lys
165 170 175

Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Glu Gln Tyr Arg Gln Leu Asn Gln Gln
180 185 190

His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Asn Val Ile Gln
195 200 205

Glu Ser Thr Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg Thr
210 215 220

Thr Pro Phe Leu His Leu Asn Glu Thr Lys Asn Val Glu His Asn Asp
225 230 235 240

Ile Pro Ala Asn Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser
245 250 255

Gly Ile Tyr Ser Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe Asn Val Tyr
260 265 270

Cys Asp Val Lys Ser Gly Ser Ser Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile
275 280 285

Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Arg Tyr Gly
290 295 300

Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr
305 310 315 320

Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Ile Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp
325 330 335

Trp Asn Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Phe Phe His Leu Gly Asn
340 345 350

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Glu Ile Thr Gly Asn Ile
355 360 365

Leu Asn Ala Leu Pro Glu His Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp
370 375 380

His Lys Ala Lys Gly His Val Asn Cys Pro Glu Ser Tyr Ser Gly Gly
385 390 395 400

Trp Trp Trp His Asn Val Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
405 410 415

Asn Lys Gln Arg Ala Lys Thr Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Tyr
420 425 430

Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met
435 440 445

Leu Ile His Pro Ile Asp Ser Glu Ser Ser Glu
450 455

<210> 5

<211> 469

<212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 5

Met Tyr Thr Ile Lys Leu Phe Leu Val Ile Ala Pro Leu Val Ile Ser
1 5 10 15

Ser Arg Ile Asp Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Asp Ser Ile Pro Pro Glu
20 25 30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
35 40 45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
50 55 60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Thr Asn Glu Ile Lys Glu Glu Glu
85 90 95

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
100 105 110

Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
115 120 125

Glu Glu Lys Ser Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
130 135 140

Leu Thr Lys Leu Ile Lys Asn Gln Pro Glu Ile Gln Glu His Pro Glu
145 150 155 160

Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ile Lys
165 170 175

Asp Leu Leu Gln Thr Met Glu Glu Gln Tyr Arg Gln Leu Asn Gln Gln
180 185 190

His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Gly Ile
195 200 205

Gln Glu Ser Thr Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
210 215 220

Thr Thr Pro Ser Phe His Leu Asn Glu Thr Lys Asp Val Glu His Asp
225 230 235 240

Asp Phe Pro Ala Asp Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
245 250 255

Ser Gly Ile Tyr Ser Ile Lys Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe Asn Val
260 265 270

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Ser Trp Ile Leu Ile Gln Arg Arg
275 280 285

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Gln Asn Tyr Lys Tyr
290 295 300

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Phe Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
305 310 315 320

Tyr Ser Ile Val Lys Arg Ser Asn Tyr Ile Leu Arg Ile Glu Leu Glu
325 330 335

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Thr Ile Glu Tyr Ser Phe His Leu Gly
340 345 350

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Glu Ile Thr Gly Asn
355 360 365

Val Pro Asn Ala Leu Pro Glu His Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
370 375 380

Asp His Lys Ala Lys Gly Gln Leu Asn Cys Leu Glu Ser Tyr Ser Gly
385 390 395 400

Gly Trp Trp Trp His Asp Val Cys Gly Gly Asp Asn Pro Asn Gly Lys
405 410 415

Tyr Asn Lys Pro Arg Ser Lys Thr Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Ile
420 425 430

Cys Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Thr Ile Lys Ser Thr Lys
435 440 445

Met Leu Ile His Pro Ile Asp Ser Glu Ser Phe Glu Leu Arg Gln Ile
450 455 460

Lys Lys Pro Met Asn
465

<210> 6

<211> 459

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 6

Met Tyr Thr Ile Lys Leu Phe Leu Ile Ile Ala Pro Leu Val Ile Ser
1 5 10 15

Ser Arg Thr Asp Gln Asp Tyr Thr Ser Leu Asp Ser Ile Ser Pro Glu
20 25 30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
35 40 45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
50 55 60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Asn Glu Ile Lys Glu Glu Glu
85 90 95

Lys Glu Leu Arg Arg Ala Thr Ser Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
100 105 110

Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asp Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
115 120 125

Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Arg Tyr Leu Glu Asp Gln
130 135 140

Leu Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Pro Gln Ile Gln Glu Tyr Leu Glu
145 150 155 160

Val Thr Ser Leu Lys Thr Leu Val Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ile Lys
165 170 175

Asp Leu Leu Gln Ile Val Glu Glu Gln Tyr Arg Gln Leu Asn Gln Gln
180 185 190

Gln Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Gly Ile
195 200 205

Lys Glu Ser Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
210 215 220

Thr Thr Pro Ser Phe His Ser Asn Glu Thr Lys Asn Val Glu His Asp
225 230 235 240

Asp Ile Pro Ala Asp Cys Thr Ile Ile Tyr Asn Gln Gly Lys His Thr
245 250 255

Ser Gly Ile Tyr Ser Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe Asn Val
260 265 270

Tyr Cys Asp Val Lys Ser Gly Ser Ser Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
275 280 285

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
290 295 300

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
305 310 315 320

Tyr Ser Ile Val Met Gln Ser Asn Tyr Ile Leu Arg Ile Glu Leu Glu

325 330 335

Asp Trp Lys Asp Lys Tyr Tyr Thr Glu Tyr Ser Phe His Leu Gly Asp
340 345 350

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Ala Glu Ile Ser Gly Asn Gly
355 360 365

Pro Lys Ala Phe Pro Glu His Lys Asp Leu Met Phe Ser Thr Trp Asp
370 375 380

His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Ser Asn Ser Gly Gly
385 390 395 400

Trp Trp Tyr His Asp Val Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
405 410 415

Asn Lys Pro Lys Ala Lys Ala Lys Pro Glu Arg Lys Glu Gly Ile Cys
420 425 430

Trp Lys Ser Gln Asp Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ala Thr Lys Met
435 440 445

Leu Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Asn Ser Glu
450 455

<210> 7

<211> 248

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ile Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro
1 5 10 15

Arg Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His
20 25 30

Asp Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His
35 40 45

Thr Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His
50 55 60

Val Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His
65 70 75 80

Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys
85 90 95

Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys
100 105 110

Ile Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu
115 120 125

Glu Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu
130 135 140

Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly
145 150 155 160

Asn Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr
165 170 175

Trp Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser
180 185 190

Gly Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly
195 200 205

Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly
210 215 220

Leu Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr
225 230 235 240

Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp
245

<210> 8

<211> 231

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
1 5 10 15

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
20 25 30

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
35 40 45

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
50 55 60

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
65 70 75 80

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
85 90 95

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
100 105 110

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
115 120 125

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
130 135 140

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
145 150 155 160

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
165 170 175

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
180 185 190

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
195 200 205

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
210 215 220

Met Leu Ile His Pro Thr Asp
225 230

<210> 9

<211> 228

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro
1 5 10 15

Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met
20 25 30

Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp
35 40 45

Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly
50 55 60

Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly
65 70 75 80

Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile
85 90 95

Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys
100 105 110

Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu
115 120 125

Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn
130 135 140

Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys
145 150 155 160

Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp
165 170 175

Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys
180 185 190

Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys
195 200 205

Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile
210 215 220

His Pro Thr Asp
225

<210> 10

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr

```
1               5                   10                  15

Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro
            20                  25                  30

Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser
        35                  40                  45

Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn
    50                  55                  60

Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu
65                  70                  75                  80

Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr
            100                 105                 110

Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu
        115                 120                 125

His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn
    130                 135                 140

Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe
145                 150                 155                 160

Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys
                165                 170                 175

Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser
            180                 185                 190

Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg
        195                 200                 205

Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp
    210                 215                 220
```

<210> 11

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
1 5 10 15

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
20 25 30

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
35 40 45

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
50 55 60

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
65 70 75 80

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
85 90 95

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
100 105 110

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
115 120 125

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
130 135 140

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
165 170 175

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
180 185 190

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
195 200 205

Met Leu Ile His Pro Thr Asp
210 215

<210> 12

<211> 460

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> K423Q

<400> 12

Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu Leu Phe Ile Val Pro Leu Val Ile Ser
1 5 10 15

Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu
20 25 30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
35 40 45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
50 55 60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu
85 90 95

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
100 105 110

Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
115 120 125

Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
130 135 140

Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu
145 150 155 160

Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys
165 170 175

Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln
180 185 190

His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile
195 200 205

Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
210 215 220

Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
225 230 235 240

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
245 250 255

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
260 265 270

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
275 280 285

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
290 295 300

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
305 310 315 320

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
325 330 335

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
340 345 350

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
355 360 365

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
370 375 380

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
385 390 395 400

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
405 410 415

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Gln Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
420 425 430

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
435 440 445

Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
450 455 460

<210> 13

<211> 460

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> K423S

<400> 13

Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu Leu Phe Ile Val Pro Leu Val Ile Ser
1 5 10 15

Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu
20 25 30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
35 40 45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
50 55 60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu
85 90 95

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
100 105 110

Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
115 120 125

Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
130 135 140

Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu
145 150 155 160

Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys
165 170 175

Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln
180 185 190

His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile
195 200 205

Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
210 215 220

Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
225 230 235 240

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
245 250 255

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
260 265 270

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
275 280 285

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
290 295 300

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
305 310 315 320

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
325 330 335

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
340 345 350

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
355 360 365

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
370 375 380

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
385 390 395 400

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
405 410 415

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
420 425 430

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
435 440 445

Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
450 455 460

<210> 14

<211> 253

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 207-460 K423Q

<400> 14

Ile Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro
1 5 10 15

Arg Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His
20 25 30

Asp Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His
35 40 45

Thr Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His
50 55 60

Val Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His
65 70 75 80

Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys
85 90 95

Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys
100 105 110

Ile Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu
115 120 125

Glu Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu
130 135 140

Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly
145 150 155 160

Asn Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr
165 170 175

Trp Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser
180 185 190

Gly Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly
195 200 205

Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Gln Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly
210 215 220

Leu Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr
225 230 235 240

Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
245 250

<210> 15

<211> 253

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 207-460 K423S

<400> 15

```
Ile Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro
1               5                   10                  15

Arg Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His
            20                  25                  30

Asp Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His
        35                  40                  45

Thr Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His
    50                  55                  60

Val Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His
65                  70                  75                  80

Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys
                85                  90                  95

Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys
            100                 105                 110

Ile Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu
        115                 120                 125

Glu Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu
    130                 135                 140

Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly
145                 150                 155                 160

Asn Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr
                165                 170                 175

Trp Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser
            180                 185                 190

Gly Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly
        195                 200                 205

Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly
    210                 215                 220

Leu Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr
225                 230                 235                 240

Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
                245                 250
```

<210> 16

<211> 236

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 225-460 K423Q

<400> 16

```
Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
1               5                   10                  15

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
            20                  25                  30

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
        35                  40                  45

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
    50                  55                  60

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
65                  70                  75                  80

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
                85                  90                  95

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
            100                 105                 110

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
        115                 120                 125

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
    130                 135                 140

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
145                 150                 155                 160

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
                165                 170                 175

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
            180                 185                 190

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Gln Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
        195                 200                 205

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
    210                 215                 220

Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
225                 230                 235
```

<210> 17

<211> 236

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 225-460 K423S

<400> 17

```
Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
1               5                   10                  15

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
            20                  25                  30

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
        35                  40                  45

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
    50                  55                  60

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
65                  70                  75                  80

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
                85                  90                  95

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
            100                 105                 110

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
        115                 120                 125

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
    130                 135                 140

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
145                 150                 155                 160

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
                165                 170                 175

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
            180                 185                 190

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
        195                 200                 205

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
    210                 215                 220

Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
225                 230                 235
```

<210> 18

<211> 236

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 225-460 S424T

<400> 18

```
Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
1               5                   10                  15

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
            20                  25                  30

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
        35                  40                  45

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
    50                  55                  60

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
65                  70                  75                  80

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
                85                  90                  95

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
            100                 105                 110

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
        115                 120                 125

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
    130                 135                 140

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
145                 150                 155                 160

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
                165                 170                 175

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
            180                 185                 190

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Thr Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
        195                 200                 205

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
    210                 215                 220

Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
225                 230                 235
```

<210> 19

<211> 235

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 226-460 K423Q

<400> 19

```
Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly
1               5                   10                  15

Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser
            20                  25                  30

Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr
        35                  40                  45

Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile
    50                  55                  60

Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr
                85                  90                  95

Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp
            100                 105                 110

Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn
        115                 120                 125

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val
    130                 135                 140

Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp
145                 150                 155                 160

His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly
                165                 170                 175

Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
            180                 185                 190

Asn Lys Pro Arg Ala Gln Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser
        195                 200                 205

Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met
    210                 215                 220

Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
225                 230                 235
```

<210> 20

<211> 235

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 226-460 K423S

<400> 20

```
Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly
1               5                   10                  15

Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser
            20                  25                  30

Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr
        35                  40                  45

Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile
    50                  55                  60

Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr
                85                  90                  95

Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp
            100                 105                 110

Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn
        115                 120                 125

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val
    130                 135                 140

Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp
145                 150                 155                 160

His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly
                165                 170                 175

Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
            180                 185                 190

Asn Lys Pro Arg Ala Ser Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser
        195                 200                 205

Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met
    210                 215                 220

Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
225                 230                 235
```

<210> 21

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 228-460 K423Q

<400> 21

```
Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro
1               5                   10                  15

Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met
            20                  25                  30

Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp
        35                  40                  45

Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly
    50                  55                  60

Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly
65                  70                  75                  80

Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile
                85                  90                  95

Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys
            100                 105                 110

Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu
        115                 120                 125

Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn
    130                 135                 140

Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys
145                 150                 155                 160

Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp
                165                 170                 175

Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys
            180                 185                 190

Pro Arg Ala Gln Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys
        195                 200                 205

Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile
    210                 215                 220

His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
225                 230
```

<210> 22

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 228-460 K423S

<400> 22

```
Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro
1               5                   10                  15

Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met
            20                  25                  30

Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp
        35                  40                  45

Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly
    50                  55                  60

Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly
65                  70                  75                  80

Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile
                85                  90                  95

Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys
            100                 105                 110

Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu
        115                 120                 125

Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn
    130                 135                 140

Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys
145                 150                 155                 160

Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp
                165                 170                 175

Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys
            180                 185                 190

Pro Arg Ala Ser Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys
        195                 200                 205

Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile
    210                 215                 220

His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
225                 230
```

<210> 23

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 228-460 S424T

<400> 23

```
Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro
1               5                   10                  15

Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met
            20                  25                  30

Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp
        35                  40                  45

Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly
    50                  55                  60

Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly
65                  70                  75                  80

Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile
                85                  90                  95

Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys
            100                 105                 110

Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu
        115                 120                 125

Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn
    130                 135                 140

Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys
145                 150                 155                 160

Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp
                165                 170                 175

Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys
            180                 185                 190

Pro Arg Ala Lys Thr Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys
        195                 200                 205

Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile
    210                 215                 220

His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
225                 230
```

<210> 24

<211> 228

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 233-460 K423Q

<400> 24

```
Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr
1               5                   10                  15

Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro
            20                  25                  30

Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser
        35                  40                  45

Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn
    50                  55                  60

Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu
65                  70                  75                  80

Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr
            100                 105                 110

Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu
        115                 120                 125

His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn
    130                 135                 140

Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe
145                 150                 155                 160

Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys
                165                 170                 175

Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Gln Ser
            180                 185                 190

Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg
        195                 200                 205

Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser
    210                 215                 220

Glu Ser Phe Glu
225
```

<210> 25

<211> 228

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 233-460 K423S

<400> 25

```
Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr
1               5                   10                  15

Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro
            20                  25                  30

Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser
        35                  40                  45

Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn
    50                  55                  60

Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu
65                  70                  75                  80
Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr
            100                 105                 110

Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu
        115                 120                 125

His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn
    130                 135                 140

Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe
145                 150                 155                 160

Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys
                165                 170                 175

Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Ser
            180                 185                 190

Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg
        195                 200                 205

Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser
    210                 215                 220

Glu Ser Phe Glu
225
```

<210> 26

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 241-460 K423Q

<400> 26

```
Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
1               5                   10                  15

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
            20                  25                  30

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
        35                  40                  45

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
    50                  55                  60

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
                85                  90                  95

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
            100                 105                 110

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
        115                 120                 125

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
    130                 135                 140

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
                165                 170                 175

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Gln Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
            180                 185                 190

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
        195                 200                 205

Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
    210                 215                 220
```

<210> 27

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 241-460 K423S

<400> 27

```
Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
1               5                   10                  15

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
            20                  25                  30

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
        35                  40                  45

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
    50                  55                  60

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
                85                  90                  95

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
            100                 105                 110

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
        115                 120                 125

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
    130                 135                 140

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
                165                 170                 175

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
            180                 185                 190

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
        195                 200                 205

Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
    210                 215                 220
```

<210> 28

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 242-460 K423Q

<400> 28

```
Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser
1               5                   10                  15

Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr
            20                  25                  30

Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile
        35                  40                  45

Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly
    50                  55                  60

Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr
65                  70                  75                  80

Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp
                85                  90                  95

Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn
            100                 105                 110

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val
        115                 120                 125

Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp
    130                 135                 140

His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
                165                 170                 175

Asn Lys Pro Arg Ala Gln Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser
            180                 185                 190

Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met
        195                 200                 205

Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
    210                 215
```

<210> 29

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 242-460 K423S

<400> 29

```
Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser
1               5                   10                  15

Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr
            20                  25                  30

Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile
        35                  40                  45

Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly
    50                  55                  60

Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr
65                  70                  75                  80

Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp
                85                  90                  95

Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn
            100                 105                 110

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val
        115                 120                 125

Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp
    130                 135                 140

His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
                165                 170                 175

Asn Lys Pro Arg Ala Ser Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser
            180                 185                 190

Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met
        195                 200                 205

Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
    210                 215
```

<210> 30

<211> 231

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 225-455 K423Q

<400> 30

```
Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
1               5                   10                  15

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
            20                  25                  30

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
        35                  40                  45

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
    50                  55                  60

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
65                  70                  75                  80

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
                85                  90                  95

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
            100                 105                 110

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
        115                 120                 125

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
    130                 135                 140

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
145                 150                 155                 160

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
                165                 170                 175

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
            180                 185                 190

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Gln Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
        195                 200                 205

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
    210                 215                 220

Met Leu Ile His Pro Thr Asp
225                 230
```

<210> 31

<211> 231

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 225-455 K423S

<400> 31

```
Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
1               5                   10                  15

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
            20                  25                  30

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
        35                  40                  45

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
    50                  55                  60

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
65                  70                  75                  80

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
                85                  90                  95

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
            100                 105                 110

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
        115                 120                 125

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
    130                 135                 140

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
145                 150                 155                 160

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
                165                 170                 175

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
            180                 185                 190

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
        195                 200                 205

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
    210                 215                 220

Met Leu Ile His Pro Thr Asp
225                 230
```

<210> 32

<211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 226-455 K423Q

<400> 32

```
Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly
1               5                   10                  15

Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser
            20                  25                  30

Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr
        35                  40                  45

Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile
    50                  55                  60

Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr
                85                  90                  95

Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp
            100                 105                 110

Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn
        115                 120                 125

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val
    130                 135                 140

Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp
145                 150                 155                 160

His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly
                165                 170                 175

Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
            180                 185                 190

Asn Lys Pro Arg Ala Gln Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser
        195                 200                 205

Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met
    210                 215                 220

Leu Ile His Pro Thr Asp
225                 230
```

<210> 33

<211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 226-455 K423S

<400> 33

```
Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly
1               5                   10                  15

Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser
            20                  25                  30

Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr
        35                  40                  45

Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile
    50                  55                  60

Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr
                85                  90                  95

Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp
            100                 105                 110

Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn
        115                 120                 125

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val
    130                 135                 140

Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp
145                 150                 155                 160

His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly
                165                 170                 175

Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
            180                 185                 190

Asn Lys Pro Arg Ala Ser Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser
        195                 200                 205

Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met
    210                 215                 220

Leu Ile His Pro Thr Asp
225                 230
```

<210> 34

<211> 228

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 228-455 K423Q

<400> 34

```
Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro
1               5                   10                  15

Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met
            20                  25                  30

Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp
        35                  40                  45

Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly
    50                  55                  60

Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly
65                  70                  75                  80

Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile
                85                  90                  95

Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys
            100                 105                 110

Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu
        115                 120                 125

Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn
    130                 135                 140

Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys
145                 150                 155                 160

Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp
                165                 170                 175

Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys
            180                 185                 190

Pro Arg Ala Gln Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys
        195                 200                 205

Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile
    210                 215                 220

His Pro Thr Asp
225
```

<210> 35

<211> 228

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 228-455 K423S

<400> 35

```
Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro
1               5                   10                  15

Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met
            20                  25                  30

Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp
        35                  40                  45

Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly
    50                  55                  60

Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly
65                  70                  75                  80

Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile
                85                  90                  95

Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys
            100                 105                 110

Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu
        115                 120                 125

Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn
    130                 135                 140

Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys
145                 150                 155                 160

Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp
                165                 170                 175

Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys
            180                 185                 190

Pro Arg Ala Ser Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys
        195                 200                 205

Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile
    210                 215                 220

His Pro Thr Asp
225
```

<210> 36

<211> 223

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 233-455 K423Q

<400> 36

```
Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr
1               5                   10                  15

Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro
            20                  25                  30

Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser
        35                  40                  45

Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn
    50                  55                  60

Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu
65                  70                  75                  80

Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr
            100                 105                 110

Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu
        115                 120                 125

His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn
    130                 135                 140

Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe
145                 150                 155                 160

Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys
                165                 170                 175

Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Gln Ser
            180                 185                 190

Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg
        195                 200                 205

Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp
    210                 215                 220
```

<210> 37

<211> 223

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 233-455 K423S

<400> 37

```
Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr
1               5                   10                  15

Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro
            20                  25                  30

Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser
        35                  40                  45

Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn
    50                  55                  60

Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu
65                  70                  75                  80

Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr
            100                 105                 110

Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu
        115                 120                 125

His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn
    130                 135                 140

Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe
145                 150                 155                 160

Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys
                165                 170                 175

Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Ser
            180                 185                 190

Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg
        195                 200                 205

Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp
    210                 215                 220
```

<210> 38

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 241-455 K423Q

<400> 38

```
Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
1               5                   10                  15

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
            20                  25                  30

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
        35                  40                  45

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
    50                  55                  60

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
                85                  90                  95

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
            100                 105                 110

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
        115                 120                 125

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
    130                 135                 140

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
                165                 170                 175

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Gln Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
            180                 185                 190

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
        195                 200                 205

Met Leu Ile His Pro Thr Asp
    210                 215
```

<210> 39

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 241-455 K423S

<400> 39

```
Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
1               5                   10                  15

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
            20                  25                  30

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
        35                  40                  45

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
    50                  55                  60

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
                85                  90                  95

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
            100                 105                 110

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
        115                 120                 125

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
    130                 135                 140

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
                165                 170                 175

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
            180                 185                 190

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
        195                 200                 205

Met Leu Ile His Pro Thr Asp
    210                 215
```

<210> 40

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 242-455 K423Q

<400> 40

```
Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser
1               5                   10                  15

Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr
            20                  25                  30

Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile
        35                  40                  45

Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly
    50                  55                  60

Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr
65                  70                  75                  80

Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp
                85                  90                  95

Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn
            100                 105                 110

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val
        115                 120                 125

Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp
    130                 135                 140

His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
                165                 170                 175

Asn Lys Pro Arg Ala Gln Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser
            180                 185                 190

Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met
        195                 200                 205

Leu Ile His Pro Thr Asp
    210
```

<210> 41

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 242-455 K423S

<400> 41

```
Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser
1               5                   10                  15

Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr
            20                  25                  30

Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile
        35                  40                  45

Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly
    50                  55                  60

Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr
65                  70                  75                  80

Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp
                85                  90                  95

Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn
            100                 105                 110

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val
        115                 120                 125

Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp
    130                 135                 140

His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
                165                 170                 175

Asn Lys Pro Arg Ala Ser Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser
            180                 185                 190

Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met
        195                 200                 205

Leu Ile His Pro Thr Asp
    210
```

<210> 42

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 227 K423Q canina

<400> 42

```
Phe Leu His Leu Asn Glu Thr Lys Asn Val Glu His Asn Asp Ile Pro
1               5                   10                  15

Ala Asn Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Ile
            20                  25                  30

Tyr Ser Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe Asn Val Tyr Cys Asp
        35                  40                  45

Val Lys Ser Gly Ser Ser Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly
    50                  55                  60

Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Arg Tyr Gly Phe Gly
65                  70                  75                  80

Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile
                85                  90                  95

Val Lys Gln Ser Asn Tyr Ile Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Asn
            100                 105                 110

Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Phe Phe His Leu Gly Asn His Glu
        115                 120                 125

Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Glu Ile Thr Gly Asn Ile Leu Asn
    130                 135                 140

Ala Leu Pro Glu His Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys
145                 150                 155                 160

Ala Lys Gly His Val Asn Cys Pro Glu Ser Tyr Ser Gly Gly Trp Trp
                165                 170                 175

Trp His Asn Val Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys
            180                 185                 190

Gln Arg Ala Gln Thr Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Tyr Trp Lys
        195                 200                 205

Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile
    210                 215                 220

His Pro Ile Asp Ser Glu Ser Ser Glu
225                 230
```

<210> 43

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 227 K423S canina

<400> 43

```
Phe Leu His Leu Asn Glu Thr Lys Asn Val Glu His Asn Asp Ile Pro
1               5                   10                  15

Ala Asn Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Ile
            20                  25                  30

Tyr Ser Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe Asn Val Tyr Cys Asp
        35                  40                  45

Val Lys Ser Gly Ser Ser Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly
    50                  55                  60

Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Arg Tyr Gly Phe Gly
65                  70                  75                  80

Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile
                85                  90                  95

Val Lys Gln Ser Asn Tyr Ile Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Asn
            100                 105                 110

Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Phe Phe His Leu Gly Asn His Glu
        115                 120                 125

Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Glu Ile Thr Gly Asn Ile Leu Asn
    130                 135                 140

Ala Leu Pro Glu His Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys
145                 150                 155                 160

Ala Lys Gly His Val Asn Cys Pro Glu Ser Tyr Ser Gly Gly Trp Trp
                165                 170                 175

Trp His Asn Val Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys
            180                 185                 190

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

Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile
    210                 215                 220

His Pro Ile Asp Ser Glu Ser Ser Glu
225                 230
```

<210> 44

<211> 708

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica225WT

<400> 44

```
actactccct ttcttcagtt gaatgaaata agaaatgtaa aacatgatgg cattcctgct      60
gaatgtacca ccatttataa cagaggtgaa catacaagtg gcatgtatgc catcagaccc     120
agcaactctc aagtttttca tgtctactgt gatgttatat caggtagtcc atggacatta     180
attcaacatc gaatagatgg atcacaaaac ttcaatgaaa cgtgggagaa ctacaaatat     240
ggttttggga ggcttgatgg agaattttgg ttgggcctag agaagatata ctccatagtg     300
aagcaatcta attatgtttt acgaattgag ttggaagact ggaaagacaa caaacattat     360
attgaatatt ctttttactt gggaaatcac gaaaccaact atacgctaca tctagttgcg     420
attactggca atgtccccaa tgcaatcccg gaaaacaaag atttggtgtt ttctacttgg     480
gatcacaaag caaaaggaca cttcaactgt ccagagggtt attcaggagg ctggtggtgg     540
catgatgagt gtggagaaaa caacctaaat ggtaaatata acaaaccaag agcaaaatct     600
aagccagaga ggagaagagg attatcttgg aagtctcaaa atggaaggtt atactctata     660
aaatcaacca aaatgttgat ccatccaaca gattcagaaa gctttgaa                  708
```

<210> 45

<211> 708

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica225 K423Q

<400> 45

```
actactccct ttcttcagtt gaatgaaata agaaatgtaa aacatgatgg cattcctgct      60
gaatgtacca ccatttataa cagaggtgaa catacaagtg gcatgtatgc catcagaccc     120
agcaactctc aagtttttca tgtctactgt gatgttatat caggtagtcc atggacatta     180
attcaacatc gaatagatgg atcacaaaac ttcaatgaaa cgtgggagaa ctacaaatat     240
ggttttggga ggcttgatgg agaattttgg ttgggcctag agaagatata ctccatagtg     300
aagcaatcta attatgtttt acgaattgag ttggaagact ggaaagacaa caaacattat     360
attgaatatt ctttttactt gggaaatcac gaaaccaact atacgctaca tctagttgcg     420
attactggca atgtccccaa tgcaatcccg gaaaacaaag atttggtgtt ttctacttgg     480
gatcacaaag caaaaggaca cttcaactgt ccagagggtt attcaggagg ctggtggtgg     540
catgatgagt gtggagaaaa caacctaaat ggtaaatata acaaaccaag agcacaatct     600
aagccagaga ggagaagagg attatcttgg aagtctcaaa atggaaggtt atactctata     660
aaatcaacca aaatgttgat ccatccaaca gattcagaaa gctttgaa                  708
```

<210> 46

<211> 708

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica225 K423S

<400> 46

```
actactccct ttcttcagtt gaatgaaata agaaatgtaa aacatgatgg cattcctgct      60
gaatgtacca ccatttataa cagaggtgaa catacaagtg gcatgtatgc catcagaccc     120
agcaactctc aagtttttca tgtctactgt gatgttatat caggtagtcc atggacatta     180
attcaacatc gaatagatgg atcacaaaac ttcaatgaaa cgtgggagaa ctacaaatat     240
ggttttggga ggcttgatgg agaattttgg ttgggcctag agaagatata ctccatagtg     300
aagcaatcta attatgtttt acgaattgag ttggaagact ggaaagacaa caaacattat     360
attgaatatt ctttttactt gggaaatcac gaaaccaact atacgctaca tctagttgcg     420
attactggca atgtccccaa tgcaatcccg gaaaacaaag atttggtgtt ttctacttgg     480
gatcacaaag caaaaggaca cttcaactgt ccagagggtt attcaggagg ctggtggtgg     540
catgatgagt gtggagaaaa caacctaaat ggtaaatata acaaaccaag agcaagctct     600
aagccagaga ggagaagagg attatcttgg aagtctcaaa atggaaggtt atactctata     660
aaatcaacca aaatgttgat ccatccaaca gattcagaaa gctttgaa                  708
```

<210> 47

<211> 705

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica226 K423Q

<400> 47

```
actccctttc ttcagttgaa tgaaataaga aatgtaaaac atgatggcat tcctgctgaa      60
tgtaccacca tttataacag aggtgaacat acaagtggca tgtatgccat cagacccagc     120
aactctcaag tttttcatgt ctactgtgat gttatatcag gtagtccatg gacattaatt     180
caacatcgaa tagatggatc acaaaacttc aatgaaacgt gggagaacta caaatatggt     240
tttgggaggc ttgatggaga attttggttg ggcctagaga agatatactc catagtgaag     300
caatctaatt atgttttacg aattgagttg gaagactgga aagacaacaa acattatatt     360
gaatattctt tttacttggg aaatcacgaa accaactata cgctacatct agttgcgatt     420
actggcaatg tccccaatgc aatcccggaa aacaaagatt tggtgttttc tacttgggat     480
cacaaagcaa aaggacactt caactgtcca gagggttatt caggaggctg gtggtggcat     540
gatgagtgtg gagaaaacaa cctaaatggt aaatataaca aaccaagagc acaatctaag     600
ccagagagga gaagaggatt atcttggaag tctcaaaatg gaaggttata ctctataaaa     660
tcaaccaaaa tgttgatcca tccaacagat tcagaaagct ttgaa                     705
```

<210> 48

<211> 705

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica226 K423S

<400> 48

```
actccctttc ttcagttgaa tgaaataaga aatgtaaaac atgatggcat tcctgctgaa      60
tgtaccacca tttataacag aggtgaacat acaagtggca tgtatgccat cagacccagc     120
aactctcaag tttttcatgt ctactgtgat gttatatcag gtagtccatg gacattaatt     180
caacatcgaa tagatggatc acaaaacttc aatgaaacgt gggagaacta caaatatggt     240
tttgggaggc ttgatggaga attttggttg ggcctagaga agatatactc catagtgaag     300
caatctaatt atgttttacg aattgagttg gaagactgga aagacaacaa acattatatt     360
gaatattctt tttacttggg aaatcacgaa accaactata cgctacatct agttgcgatt     420
actggcaatg tccccaatgc aatcccggaa aacaaagatt tggtgttttc tacttgggat     480
cacaaagcaa aaggacactt caactgtcca gagggttatt caggaggctg gtggtggcat     540
gatgagtgtg gagaaaacaa cctaaatggt aaatataaca aaccaagagc aagctctaag     600
ccagagagga gaagaggatt atcttggaag tctcaaaatg gaaggttata ctctataaaa     660
tcaaccaaaa tgttgatcca tccaacagat tcagaaagct ttgaa                     705
```

<210> 49

<211> 699

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica228 K423Q

<400> 49

```
tttcttcagt tgaatgaaat aagaaatgta aaacatgatg gcattcctgc tgaatgtacc      60
accatttata acagaggtga acatacaagt ggcatgtatg ccatcagacc cagcaactct     120
caagtttttc atgtctactg tgatgttata tcaggtagtc catggacatt aattcaacat     180
cgaatagatg gatcacaaaa cttcaatgaa acgtgggaga actacaaata tggttttggg     240
aggcttgatg gagaattttg gttgggccta gagaagatat actccatagt gaagcaatct     300
aattatgttt tacgaattga gttggaagac tggaaagaca acaaacatta tattgaatat     360
tctttttact tgggaaatca cgaaaccaac tatacgctac atctagttgc gattactggc     420
aatgtcccca atgcaatccc ggaaaacaaa gatttggtgt tttctacttg ggatcacaaa     480
gcaaaaggac acttcaactg tccagagggt tattcaggag gctggtggtg gcatgatgag     540
tgtggagaaa acaacctaaa tggtaaatat aacaaaccaa gagcacaatc taagccagag     600
aggagaagag gattatcttg gaagtctcaa aatggaaggt tatactctat aaaatcaacc     660
aaaatgttga tccatccaac agattcagaa agctttgaa                            699
```

<210> 50

<211> 699

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica228 K423S

<400> 50

```
tttcttcagt tgaatgaaat aagaaatgta aaacatgatg gcattcctgc tgaatgtacc      60
accatttata acagaggtga acatacaagt ggcatgtatg ccatcagacc cagcaactct     120
caagtttttc atgtctactg tgatgttata tcaggtagtc catggacatt aattcaacat     180
cgaatagatg gatcacaaaa cttcaatgaa acgtgggaga actacaaata tggttttggg     240
aggcttgatg gagaattttg gttgggccta gagaagatat actccatagt gaagcaatct     300
aattatgttt tacgaattga gttggaagac tggaaagaca acaaacatta tattgaatat     360
tctttttact tgggaaatca cgaaaccaac tatacgctac atctagttgc gattactggc     420
aatgtcccca atgcaatccc ggaaaacaaa gatttggtgt tttctacttg ggatcacaaa     480
gcaaaaggac acttcaactg tccagagggt tattcaggag gctggtggtg gcatgatgag     540
tgtggagaaa acaacctaaa tggtaaatat aacaaaccaa gagcaagctc taagccagag     600
aggagaagag gattatcttg gaagtctcaa aatggaaggt tatactctat aaaatcaacc     660
aaaatgttga tccatccaac agattcagaa agctttgaa                            699
```

<210> 51

<211> 684

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica233 K423Q

<400> 51

```
gaaataagaa atgtaaaaca tgatggcatt cctgctgaat gtaccaccat ttataacaga      60
ggtgaacata caagtggcat gtatgccatc agacccagca actctcaagt ttttcatgtc     120
tactgtgatg ttatatcagg tagtccatgg acattaattc aacatcgaat agatggatca     180
caaaacttca atgaaacgtg ggagaactac aaatatggtt ttgggaggct tgatggagaa     240
ttttggttgg gcctagagaa gatatactcc atagtgaagc aatctaatta tgttttacga     300
attgagttgg aagactggaa agacaacaaa cattatattg aatattcttt ttacttggga     360
aatcacgaaa ccaactatac gctacatcta gttgcgatta ctggcaatgt ccccaatgca     420
atcccggaaa acaaagattt ggtgttttct acttgggatc acaaagcaaa aggacacttc     480
aactgtccag agggttattc aggaggctgg tggtggcatg atgagtgtgg agaaaacaac     540
ctaaatggta aatataacaa accaagagca caatctaagc cagagaggag aagaggatta     600
tcttggaagt ctcaaaatgg aaggttatac tctataaaat caaccaaaat gttgatccat     660
ccaacagatt cagaaagctt tgaa                                            684
```

<210> 52

<211> 684

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica233 K423S

<400> 52

```
gaaataagaa atgtaaaaca tgatggcatt cctgctgaat gtaccaccat ttataacaga      60
ggtgaacata caagtggcat gtatgccatc agacccagca actctcaagt ttttcatgtc     120
tactgtgatg ttatatcagg tagtccatgg acattaattc aacatcgaat agatggatca     180
caaaacttca atgaaacgtg ggagaactac aaatatggtt ttgggaggct tgatggagaa     240
ttttggttgg gcctagagaa gatatactcc atagtgaagc aatctaatta tgttttacga     300
attgagttgg aagactggaa agacaacaaa cattatattg aatattcttt ttacttggga     360
aatcacgaaa ccaactatac gctacatcta gttgcgatta ctggcaatgt ccccaatgca     420
atcccggaaa acaaagattt ggtgttttct acttgggatc acaaagcaaa aggacacttc     480
aactgtccag agggttattc aggaggctgg tggtggcatg atgagtgtgg agaaaacaac     540
ctaaatggta aatataacaa accaagagca agctctaagc cagagaggag aagaggatta     600
tcttggaagt ctcaaaatgg aaggttatac tctataaaat caaccaaaat gttgatccat     660
ccaacagatt cagaaagctt tgaa                                            684
```

<210> 53

<211> 660

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica241 K423Q

<400> 53

```
ggcattcctg ctgaatgtac caccatttat aacagaggtg aacatacaag tggcatgtat      60
gccatcagac ccagcaactc tcaagttttt catgtctact gtgatgttat atcaggtagt     120
ccatggacat taattcaaca tcgaatagat ggatcacaaa acttcaatga aacgtgggag     180
aactacaaat atggttttgg gaggcttgat ggagaatttt ggttgggcct agagaagata     240
tactccatag tgaagcaatc taattatgtt ttacgaattg agttggaaga ctggaaagac     300
aacaaacatt atattgaata ttctttttac ttgggaaatc acgaaaccaa ctatacgcta     360
catctagttg cgattactgg caatgtcccc aatgcaatcc cggaaaacaa agatttggtg     420
ttttctactt gggatcacaa agcaaaagga cacttcaact gtccagaggg ttattcagga     480
ggctggtggt ggcatgatga gtgtggagaa aacaacctaa atggtaaata taacaaacca     540
agagcacaat ctaagccaga gaggagaaga ggattatctt ggaagtctca aaatggaagg     600
ttatactcta taaaatcaac caaaatgttg atccatccaa cagattcaga aagctttgaa     660
```

<210> 54

<211> 660

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica241 K423S

<400> 54

```
ggcattcctg ctgaatgtac caccatttat aacagaggtg aacatacaag tggcatgtat      60
gccatcagac ccagcaactc tcaagttttt catgtctact gtgatgttat atcaggtagt     120
ccatggacat taattcaaca tcgaatagat ggatcacaaa acttcaatga aacgtgggag     180
aactacaaat atggttttgg gaggcttgat ggagaatttt ggttgggcct agagaagata     240
tactccatag tgaagcaatc taattatgtt ttacgaattg agttggaaga ctggaaagac     300
aacaaacatt atattgaata ttctttttac ttgggaaatc acgaaaccaa ctatacgcta     360
catctagttg cgattactgg caatgtcccc aatgcaatcc cggaaaacaa agatttggtg     420
ttttctactt gggatcacaa agcaaaagga cacttcaact gtccagaggg ttattcagga     480
ggctggtggt ggcatgatga gtgtggagaa aacaacctaa atggtaaata taacaaacca     540
agagcaagct ctaagccaga gaggagaaga ggattatctt ggaagtctca aaatggaagg     600
ttatactcta taaaatcaac caaaatgttg atccatccaa cagattcaga aagctttgaa     660
```

<210> 55

<211> 657

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica242 K423Q

<400> 55

```
attcctgctg aatgtaccac catttataac agaggtgaac atacaagtgg catgtatgcc      60
atcagaccca gcaactctca agtttttcat gtctactgtg atgttatatc aggtagtcca     120
tggacattaa ttcaacatcg aatagatgga tcacaaaact tcaatgaaac gtgggagaac     180
tacaaatatg gttttgggag gcttgatgga gaattttggt tgggcctaga gaagatatac     240
tccatagtga agcaatctaa ttatgtttta cgaattgagt tggaagactg gaaagacaac     300
aaacattata ttgaatattc tttttacttg ggaaatcacg aaaccaacta tacgctacat     360
ctagttgcga ttactggcaa tgtccccaat gcaatcccgg aaaacaaaga tttggtgttt     420
tctacttggg atcacaaagc aaaaggacac ttcaactgtc cagagggtta ttcaggaggc     480
tggtggtggc atgatgagtg tggagaaaac aacctaaatg gtaaatataa caaaccaaga     540
gcacaatcta agccagagag gagaagagga ttatcttgga agtctcaaaa tggaaggtta     600
tactctataa aatcaaccaa aatgttgatc catccaacag attcagaaag ctttgaa        657
```

<210> 56

<211> 657

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica242 K423S

<400> 56

```
attcctgctg aatgtaccac catttataac agaggtgaac atacaagtgg catgtatgcc      60
atcagaccca gcaactctca agtttttcat gtctactgtg atgttatatc aggtagtcca     120
```

```
tggacattaa ttcaacatcg aatagatgga tcacaaaact tcaatgaaac gtgggagaac      180
tacaaatatg gttttgggag gcttgatgga gaattttggt tgggcctaga gaagatatac      240
tccatagtga agcaatctaa ttatgtttta cgaattgagt tggaagactg gaaagacaac      300
aaacattata ttgaatattc tttttacttg ggaaatcacg aaaccaacta tacgctacat      360
ctagttgcga ttactggcaa tgtccccaat gcaatcccgg aaaacaaaga tttggtgttt      420
tctacttggg atcacaaagc aaaaggacac ttcaactgtc cagagggtta ttcaggaggc      480
tggtggtggc atgatgagtg tggagaaaac aacctaaatg gtaaatataa caaaccaaga      540
gcaagctcta agccagagag gagaagagga ttatcttgga agtctcaaaa tggaaggtta      600
tactctataa aatcaaccaa aatgttgatc catccaacag attcagaaag ctttgaa         657
```

<210> 57

<211> 699

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico que codifica 227KQ canina

<400> 57

```
tttttgcatc tcaacgaaac gaagaatgtc gaacacaacg acattccggc aaattgcaca       60
actatctaca atagaggcga acatacgtcc ggtatctact ccattagacc ttcaaacagc      120
caggtattca atgtgtactg cgatgtaaag tcaggatcgt catggacact gatccagcat      180
aggatcgacg ggtcccagaa cttcaacgag acatgggaga actaccgcta tggatttgga      240
aggctggatg gggagttctg gttgggactt gagaaaatct acagcattgt gaagcagtcg      300
aactacattc tccggattga actggaggac tggaatgaca acaaacacta catcgagtat      360
ttctttcatc tcggcaacca tgaaacgaat tacaccttgc accttgtgga aatcacgggc      420
aacattttga acgcgctgcc agaacacaaa gacctggtgt tttcgacatg ggatcacaaa      480
gcaaaggggc acgtgaactg tcccgaatca tatagcgggg gatggtggtg gcacaatgtc      540
tgtggtgaga acaatctcaa cgggaaatac aataagcagc gagctcagac gaaacccgag      600
cggcggagag gtctgtattg gaagtcgcag aatggacgcc tgtattcgat caaatcgacg      660
aaaatgctca tccaccccat cgactccgaa tcgtcggag                             699
```

<210> 58

<211> 252

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 201-460 K423del

<400> 58

```
Ile Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro
1               5                   10                  15

Arg Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His
            20                  25                  30

Asp Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His
        35                  40                  45

Thr Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His
    50                  55                  60

Val Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His
65                  70                  75                  80

Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys
                85                  90                  95

Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys
            100                 105                 110

Ile Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu
        115                 120                 125

Glu Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu
    130                 135                 140

Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly
145                 150                 155                 160

Asn Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr
                165                 170                 175

Trp Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser
            180                 185                 190

Gly Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly
        195                 200                 205

Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
    210                 215                 220

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
225                 230                 235                 240

Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
                245                 250
```

<210> 59

<211> 235

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 225-460 K423del

<400> 59

```
Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
1               5                   10                  15

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
            20                  25                  30

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
        35                  40                  45

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
    50                  55                  60

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
65                  70                  75                  80

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
                85                  90                  95

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
            100                 105                 110

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
        115                 120                 125

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
    130                 135                 140

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
145                 150                 155                 160

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
                165                 170                 175

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
            180                 185                 190

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser
        195                 200                 205

Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met
    210                 215                 220

Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
225                 230                 235
```

<210> 60

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 226-460 K423del

<400> 60

```
Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly
1               5                   10                  15

Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser
            20                  25                  30

Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr
        35                  40                  45

Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile
    50                  55                  60

Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr
                85                  90                  95

Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp
            100                 105                 110

Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn
        115                 120                 125

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val
    130                 135                 140

Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp
145                 150                 155                 160

His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly
                165                 170                 175

Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
            180                 185                 190

Asn Lys Pro Arg Ala Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp
        195                 200                 205

Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu
    210                 215                 220

Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
225                 230
```

<210> 61

<211> 232

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 228-460 K423del

<400> 61

```
Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro
1               5                   10                  15

Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met
            20                  25                  30

Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp
        35                  40                  45

Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly
    50                  55                  60

Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly
65                  70                  75                  80

Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile
                85                  90                  95

Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys
            100                 105                 110

Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu
        115                 120                 125

Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn
    130                 135                 140

Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys
145                 150                 155                 160

Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp
                165                 170                 175

Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys
            180                 185                 190

Pro Arg Ala Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys Ser
        195                 200                 205

Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His
    210                 215                 220

Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
225                 230
```

<210> 62

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 233-460 K423del

<400> 62

```
Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr
1               5                   10                  15

Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro
            20                  25                  30

Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser
        35                  40                  45

Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn
    50                  55                  60

Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu
65                  70                  75                  80

Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr
            100                 105                 110

Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu
        115                 120                 125

His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn
    130                 135                 140

Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe
145                 150                 155                 160

Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys
                165                 170                 175

Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Lys
            180                 185                 190

Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu
        195                 200                 205

Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu
    210                 215                 220

Ser Phe Glu
225
```

<210> 63

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 241-460 K423del

<400> 63

```
Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
1               5                   10                  15

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
            20                  25                  30

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
        35                  40                  45

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
    50                  55                  60

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
                85                  90                  95

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
            100                 105                 110

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
        115                 120                 125

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
    130                 135                 140

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
                165                 170                 175

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser
            180                 185                 190

Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met
        195                 200                 205

Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
    210                 215
```

<210> 64

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 242-460 K423del

<400> 64

```
Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser
1               5                   10                  15

Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr
            20                  25                  30

Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile
        35                  40                  45

Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly
    50                  55                  60

Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr
65                  70                  75                  80

Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp
                85                  90                  95

Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn
            100                 105                 110

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val
        115                 120                 125

Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp
    130                 135                 140

His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
                165                 170                 175

Asn Lys Pro Arg Ala Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp
            180                 185                 190

Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu
        195                 200                 205

Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
    210                 215
```

<210> 65

<211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 225-455 K423del

<400> 65

```
Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
1               5                   10                  15

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
            20                  25                  30

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
        35                  40                  45

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
    50                  55                  60

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
65                  70                  75                  80

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
                85                  90                  95

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
            100                 105                 110

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
        115                 120                 125

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
    130                 135                 140

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
145                 150                 155                 160

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
                165                 170                 175

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
            180                 185                 190

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser
        195                 200                 205

Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met
    210                 215                 220

Leu Ile His Pro Thr Asp
225                 230
```

<210> 66

<211> 229

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 226-455 K423del

<400> 66

```
Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly
1               5                   10                  15

Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser
            20                  25                  30

Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr
        35                  40                  45

Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile
    50                  55                  60

Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr
                85                  90                  95

Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp
            100                 105                 110

Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn
        115                 120                 125

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val
    130                 135                 140

Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp
145                 150                 155                 160

His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly
                165                 170                 175

Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
            180                 185                 190

Asn Lys Pro Arg Ala Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp
        195                 200                 205

Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu
    210                 215                 220

Ile His Pro Thr Asp
225
```

<210> 67

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 228-455 K423del

<400> 67

```
Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro
1               5                   10                  15

Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met
            20                  25                  30

Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp
        35                  40                  45

Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly
    50                  55                  60

Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly
65                  70                  75                  80

Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile
                85                  90                  95

Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys
            100                 105                 110

Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu
        115                 120                 125

Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn
    130                 135                 140

Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys
145                 150                 155                 160

Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp
                165                 170                 175

Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys
            180                 185                 190

Pro Arg Ala Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys Ser
        195                 200                 205

Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His
    210                 215                 220

Pro Thr Asp
225
```

<210> 68

<211> 222

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 233-455 K423del

<400> 68

```
Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr
1               5                   10                  15

Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro
            20                  25                  30

Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser
        35                  40                  45

Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn
    50                  55                  60

Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu
65                  70                  75                  80

Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr
            100                 105                 110

Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu
        115                 120                 125

His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn
    130                 135                 140

Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe
145                 150                 155                 160

Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys
                165                 170                 175

Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Lys
            180                 185                 190

Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu
        195                 200                 205

Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp
    210                 215                 220
```

<210> 69

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 241-455 K423del

<400> 69

```
Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
1               5                   10                  15

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
            20                  25                  30

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
        35                  40                  45

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
    50                  55                  60

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
                85                  90                  95

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
            100                 105                 110

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
        115                 120                 125

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
    130                 135                 140

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
                165                 170                 175

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser
            180                 185                 190

Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met
        195                 200                 205

Leu Ile His Pro Thr Asp
    210
```

<210> 70

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> 242-455 K423del

<400> 70

```
Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr Ser
1               5                   10                  15

Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val Tyr
            20                  25                  30

Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg Ile
        35                  40                  45

Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr Gly
    50                  55                  60

Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile Tyr
65                  70                  75                  80

Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu Asp
                85                  90                  95

Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly Asn
            100                 105                 110

His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn Val
        115                 120                 125

Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp Asp
    130                 135                 140

His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys Tyr
                165                 170                 175

Asn Lys Pro Arg Ala Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu Ser Trp
            180                 185                 190

Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys Met Leu
        195                 200                 205

Ile His Pro Thr Asp
    210
```

<210> 71

<211> 491

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

```
Met Lys Thr Phe Thr Trp Thr Leu Gly Val Leu Phe Phe Leu Leu Val
1               5                   10                  15

Asp Thr Gly His Cys Arg Gly Gly Gln Phe Lys Ile Lys Lys Ile Asn
            20                  25                  30

Gln Arg Arg Tyr Pro Arg Ala Thr Asp Gly Lys Glu Glu Ala Lys Lys
        35                  40                  45

Cys Ala Tyr Thr Phe Leu Val Pro Glu Gln Arg Ile Thr Gly Pro Ile
    50                  55                  60

Cys Val Asn Thr Lys Gly Gln Asp Ala Ser Thr Ile Lys Asp Met Ile
65                  70                  75                  80

Thr Arg Met Asp Leu Glu Asn Leu Lys Asp Val Leu Ser Arg Gln Lys
                85                  90                  95

Arg Glu Ile Asp Val Leu Gln Leu Val Val Asp Val Asp Gly Asn Ile
            100                 105                 110

Val Asn Glu Val Lys Leu Leu Arg Lys Glu Ser Arg Asn Met Asn Ser
        115                 120                 125

Arg Val Thr Gln Leu Tyr Met Gln Leu Leu His Glu Ile Ile Arg Lys
    130                 135                 140

Arg Asp Asn Ser Leu Glu Leu Ser Gln Leu Glu Asn Lys Ile Leu Asn
```

145 150 155 160

Val Thr Thr Glu Met Leu Lys Met Ala Thr Arg Tyr Arg Glu Leu Glu
165 170 175

Val Lys Tyr Ala Ser Leu Thr Asp Leu Val Asn Asn Gln Ser Val Met
180 185 190

Ile Thr Leu Leu Glu Glu Gln Cys Leu Arg Ile Phe Ser Arg Gln Asp
195 200 205

Thr His Val Ser Pro Pro Leu Val Gln Val Val Pro Gln His Ile Pro
210 215 220

Asn Ser Gln Gln Tyr Thr Pro Gly Leu Leu Gly Gly Asn Glu Ile Gln
225 230 235 240

Arg Asp Pro Gly Tyr Pro Arg Asp Leu Met Pro Pro Pro Asp Leu Ala
245 250 255

Thr Ser Pro Thr Lys Ser Pro Phe Lys Ile Pro Pro Val Thr Phe Ile
260 265 270

Asn Glu Gly Pro Phe Lys Asp Cys Gln Gln Ala Lys Glu Ala Gly His
275 280 285

Ser Val Ser Gly Ile Tyr Met Ile Lys Pro Glu Asn Ser Asn Gly Pro
290 295 300

Met Gln Leu Trp Cys Glu Asn Ser Leu Asp Pro Gly Gly Trp Thr Val
305 310 315 320

Ile Gln Lys Arg Thr Asp Gly Ser Val Asn Phe Phe Arg Asn Trp Glu
325 330 335

Asn Tyr Lys Lys Gly Phe Gly Asn Ile Asp Gly Glu Tyr Trp Leu Gly
340 345 350

Leu Glu Asn Ile Tyr Met Leu Ser Asn Gln Asp Asn Tyr Lys Leu Leu
355 360 365

Ile Glu Leu Glu Asp Trp Ser Asp Lys Lys Val Tyr Ala Glu Tyr Ser
370 375 380

Ser Phe Arg Leu Glu Pro Glu Ser Glu Phe Tyr Arg Leu Arg Leu Gly
385 390 395 400

```
Thr Tyr Gln Gly Asn Ala Gly Asp Ser Met Met Trp His Asn Gly Lys
                405                 410                 415

Gln Phe Thr Thr Leu Asp Arg Asp Lys Asp Met Tyr Ala Gly Asn Cys
            420                 425                 430

Ala His Phe His Lys Gly Gly Trp Trp Tyr Asn Ala Cys Ala His Ser
        435                 440                 445

Asn Leu Asn Gly Val Trp Tyr Arg Gly Gly His Tyr Arg Ser Lys His
    450                 455                 460

Gln Asp Gly Ile Phe Trp Ala Glu Tyr Arg Gly Gly Ser Tyr Ser Leu
465                 470                 475                 480

Arg Ala Val Gln Met Met Ile Lys Pro Ile Asp
                485                 490
```

<210> 72

<211> 221

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cterminal hANGPTL1 271-491

<400> 72

```
Phe Ile Asn Glu Gly Pro Phe Lys Asp Cys Gln Gln Ala Lys Glu Ala
1               5                   10                  15

Gly His Ser Val Ser Gly Ile Tyr Met Ile Lys Pro Glu Asn Ser Asn
            20                  25                  30

Gly Pro Met Gln Leu Trp Cys Glu Asn Ser Leu Asp Pro Gly Gly Trp
        35                  40                  45

Thr Val Ile Gln Lys Arg Thr Asp Gly Ser Val Asn Phe Phe Arg Asn
    50                  55                  60

Trp Glu Asn Tyr Lys Lys Gly Phe Gly Asn Ile Asp Gly Glu Tyr Trp
65                  70                  75                  80

Leu Gly Leu Glu Asn Ile Tyr Met Leu Ser Asn Gln Asp Asn Tyr Lys
                85                  90                  95

Leu Leu Ile Glu Leu Glu Asp Trp Ser Asp Lys Lys Val Tyr Ala Glu
            100                 105                 110
```

Tyr Ser Ser Phe Arg Leu Glu Pro Glu Ser Glu Phe Tyr Arg Leu Arg
115 120 125

Leu Gly Thr Tyr Gln Gly Asn Ala Gly Asp Ser Met Met Trp His Asn
130 135 140

Gly Lys Gln Phe Thr Thr Leu Asp Arg Asp Lys Asp Met Tyr Ala Gly
145 150 155 160

Asn Cys Ala His Phe His Lys Gly Gly Trp Trp Tyr Asn Ala Cys Ala
165 170 175

His Ser Asn Leu Asn Gly Val Trp Tyr Arg Gly Gly His Tyr Arg Ser
180 185 190

Lys His Gln Asp Gly Ile Phe Trp Ala Glu Tyr Arg Gly Gly Ser Tyr
195 200 205

Ser Leu Arg Ala Val Gln Met Met Ile Lys Pro Ile Asp
210 215 220

<210> 73

<211> 406

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Met Ser Gly Ala Pro Thr Ala Gly Ala Ala Leu Met Leu Cys Ala Ala
1 5 10 15

Thr Ala Val Leu Leu Ser Ala Gln Gly Gly Pro Val Gln Ser Lys Ser
20 25 30

Pro Arg Phe Ala Ser Trp Asp Glu Met Asn Val Leu Ala His Gly Leu
35 40 45

Leu Gln Leu Gly Gln Gly Leu Arg Glu His Ala Glu Arg Thr Arg Ser
50 55 60

Gln Leu Ser Ala Leu Glu Arg Arg Leu Ser Ala Cys Gly Ser Ala Cys
65 70 75 80

Gln Gly Thr Glu Gly Ser Thr Asp Leu Pro Leu Ala Pro Glu Ser Arg
85 90 95

Val Asp Pro Glu Val Leu His Ser Leu Gln Thr Gln Leu Lys Ala Gln
100 105 110

Asn Ser Arg Ile Gln Gln Leu Phe His Lys Val Ala Gln Gln Gln Arg
115 120 125

His Leu Glu Lys Gln His Leu Arg Ile Gln His Leu Gln Ser Gln Phe
130 135 140

Gly Leu Leu Asp His Lys His Leu Asp His Glu Val Ala Lys Pro Ala
145 150 155 160

Arg Arg Lys Arg Leu Pro Glu Met Ala Gln Pro Val Asp Pro Ala His
165 170 175

Asn Val Ser Arg Leu His Arg Leu Pro Arg Asp Cys Gln Glu Leu Phe
180 185 190

Gln Val Gly Glu Arg Gln Ser Gly Leu Phe Glu Ile Gln Pro Gln Gly
195 200 205

Ser Pro Pro Phe Leu Val Asn Cys Lys Met Thr Ser Asp Gly Gly Trp
210 215 220

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

Trp Glu Ala Tyr Lys Ala Gly Phe Gly Asp Pro His Gly Glu Phe Trp
245 250 255

Leu Gly Leu Glu Lys Val His Ser Ile Thr Gly Asp Arg Asn Ser Arg
260 265 270

Leu Ala Val Gln Leu Arg Asp Trp Asp Gly Asn Ala Glu Leu Leu Gln
275 280 285

Phe Ser Val His Leu Gly Gly Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Leu Gln Leu
290 295 300

Thr Ala Pro Val Ala Gly Gln Leu Gly Ala Thr Thr Val Pro Pro Ser
305 310 315 320

Gly Leu Ser Val Pro Phe Ser Thr Trp Asp Gln Asp His Asp Leu Arg
325 330 335

Arg Asp Lys Asn Cys Ala Lys Ser Leu Ser Gly Gly Trp Trp Phe Gly
340 345 350

Thr Cys Ser His Ser Asn Leu Asn Gly Gln Tyr Phe Arg Ser Ile Pro
355 360 365

Gln Gln Arg Gln Lys Leu Lys Lys Gly Ile Phe Trp Lys Thr Trp Arg
370 375 380

Gly Arg Tyr Tyr Pro Leu Gln Ala Thr Thr Met Leu Ile Gln Pro Met
385 390 395 400

Ala Ala Glu Ala Ala Ser
405

<210> 74

<211> 228

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cterminal hANGPTL4 179-406

<400> 74

```
Ser Arg Leu His Arg Leu Pro Arg Asp Cys Gln Glu Leu Phe Gln Val
1               5                   10                  15

Gly Glu Arg Gln Ser Gly Leu Phe Glu Ile Gln Pro Gln Gly Ser Pro
            20                  25                  30

Pro Phe Leu Val Asn Cys Lys Met Thr Ser Asp Gly Gly Trp Thr Val
        35                  40                  45

Ile Gln Arg Arg His Asp Gly Ser Val Asp Phe Asn Arg Pro Trp Glu
    50                  55                  60

Ala Tyr Lys Ala Gly Phe Gly Asp Pro His Gly Glu Phe Trp Leu Gly
65                  70                  75                  80

Leu Glu Lys Val His Ser Ile Thr Gly Asp Arg Asn Ser Arg Leu Ala
                85                  90                  95

Val Gln Leu Arg Asp Trp Asp Gly Asn Ala Glu Leu Leu Gln Phe Ser
            100                 105                 110

Val His Leu Gly Gly Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Leu Gln Leu Thr Ala
        115                 120                 125

Pro Val Ala Gly Gln Leu Gly Ala Thr Thr Val Pro Pro Ser Gly Leu
    130                 135                 140

Ser Val Pro Phe Ser Thr Trp Asp Gln Asp His Asp Leu Arg Arg Asp
145                 150                 155                 160

Lys Asn Cys Ala Lys Ser Leu Ser Gly Gly Trp Trp Phe Gly Thr Cys
                165                 170                 175

Ser His Ser Asn Leu Asn Gly Gln Tyr Phe Arg Ser Ile Pro Gln Gln
            180                 185                 190

Arg Gln Lys Leu Lys Lys Gly Ile Phe Trp Lys Thr Trp Arg Gly Arg
        195                 200                 205

Tyr Tyr Pro Leu Gln Ala Thr Thr Met Leu Ile Gln Pro Met Ala Ala
    210                 215                 220

Glu Ala Ala Ser
225
```

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias de la Tabla 1, en donde el polipéptido comprende un aminoácido que es un aminoácido polar distinto de K o R en la posición 423, como se determina con referencia a la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido tiene actividad condrogénica.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de (i) SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, o SEQ ID NO:70; o (ii) SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, o SEQ ID NO:64.

3. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de (i) SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, o SEQ ID NO:70; o (ii) SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, o SEQ ID NO:64.

4. El polipéptido de la reivindicación 3, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

5. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de (i) SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, y SEQ ID NO:70; o (ii) SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, o SEQ ID NO:64.

6. El polipéptido de la reivindicación 5, en donde el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5, en donde el aminoácido en la posición 423 es Q o S o el aminoácido en la posición 423 es suprimido.

8. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el polipéptido está PEGilado.

9. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el polipéptido está fusionado a cualquiera de las albúminas de suero humano (HSA), una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), una polihistidina, una glutatión S transferasa (GST), una tiorredoxina, una proteína A, una proteína G o una proteína de unión a maltosa (MBP), o un fragmento de la misma y en donde el péptido está fusionado en el extremo amino terminal del polipéptido o en el extremo carboxi terminal del polipéptido.

10. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, que comprende además un ácido hialurónico o un derivado del mismo, o que comprende adicionalmente un agente seleccionado del grupo que consiste en calcitonina de salmón oral, SD-6010 (inhibidor de iNOS), vitamina D3 (coliquecalciferol), hidrolizado de colágeno, FGF18, BMP7, acetato de rusalatide, insaponificables de soja de aguacate (ASU), kartogenina, un esteroide y un agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE).

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 para uso en el tratamiento, mejora o prevención de artritis o daño articular en un paciente.

13. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para uso en un método para inducir la diferenciación de células madre mesenquimales en condrocitos.

14. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el método se realiza in vivo y las células madre están presentes en un sujeto humano.

15. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el sujeto tiene artritis o daño en las articulaciones o el sujeto está en riesgo de sufrir artritis o daño articular.

16. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 12 o el polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la artritis es la osteoartritis, la artritis por traumatismo o la artritis autoinmune.

17. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 12 o el polipéptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en donde la administración de la composición farmacéutica o polipéptido ocurre (i) durante o después de un procedimiento quirúrgico, (ii) ocurre en conjunto con uno o más factores condrogénicos adicionales,2 (iii) ocurre junto con uno cualquiera de estimulación de médula ósea, reemplazo de cartílago, implantación de condrocitos autólogos (ACI), implante de condrocitos autólogos inducido por matriz (MACI) o (iv) se produce en una matriz o andamiaje biocompatible.

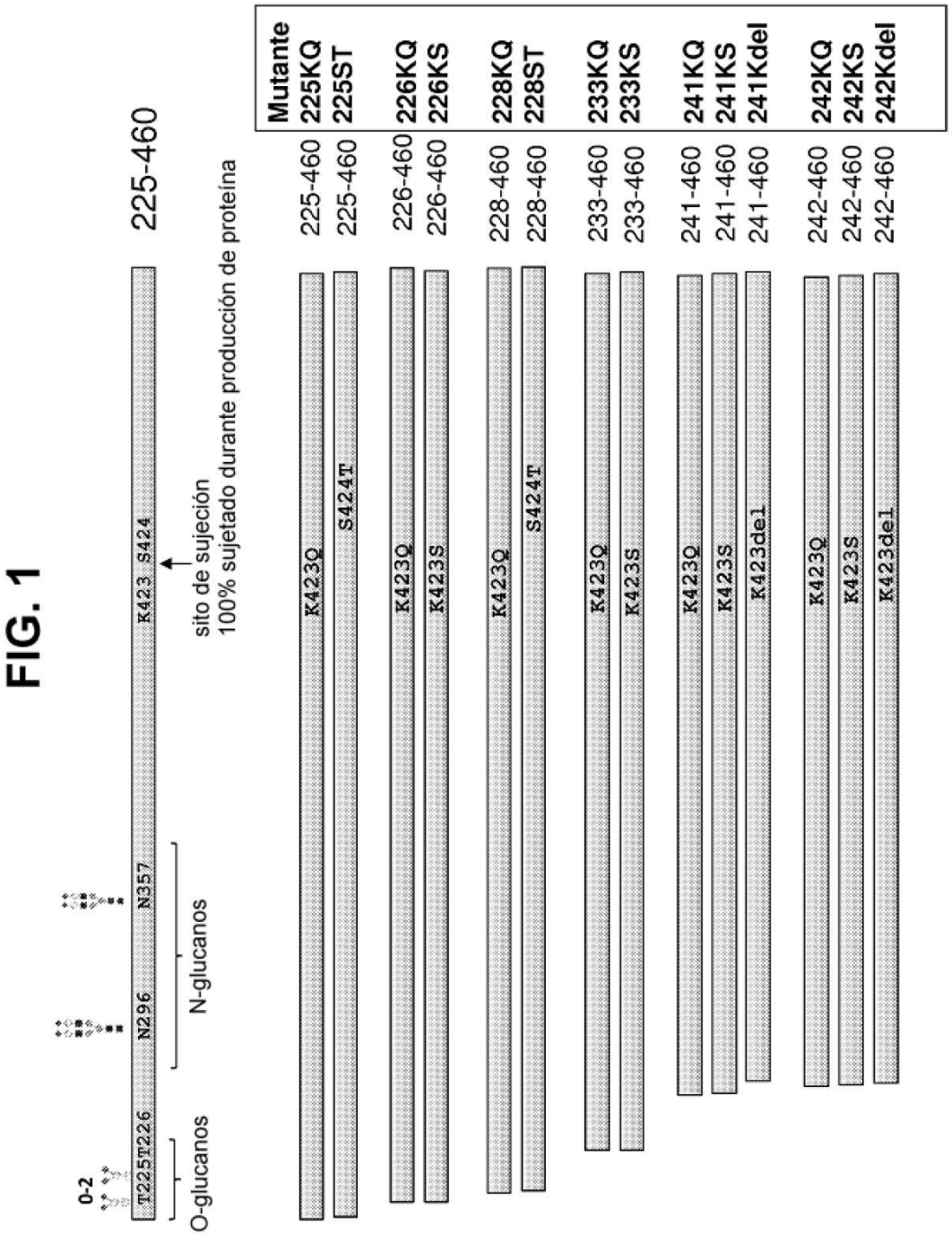
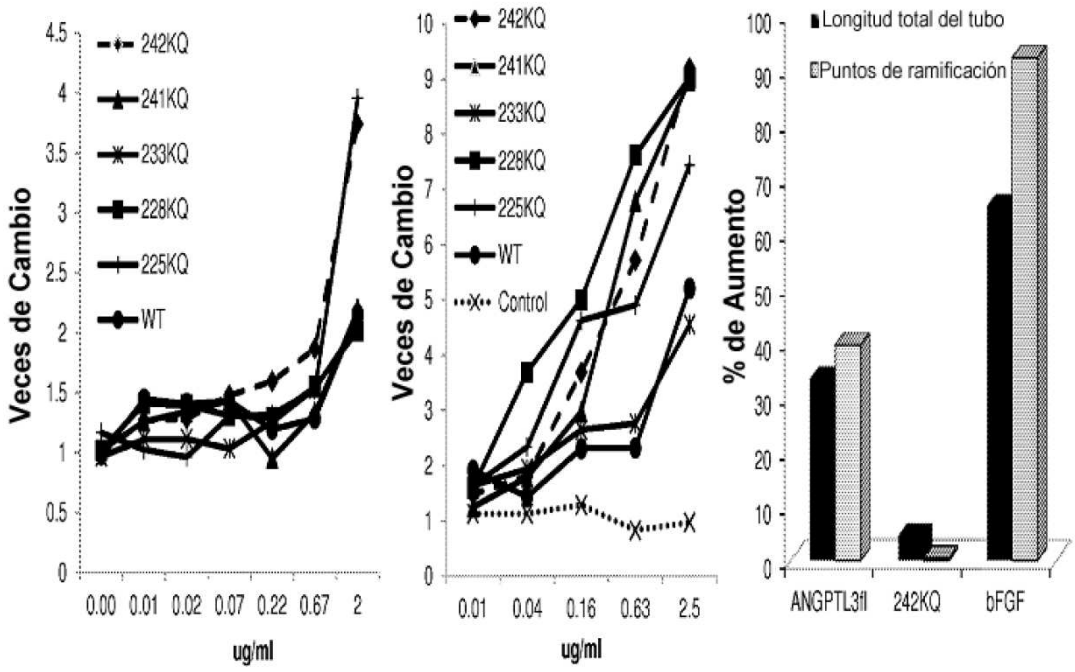

0-2
T225T226
N296
N357
K423 S424
225-460
O-glucanos
N-glucanos
sito de sujeción
100% sujetado durante producción de proteína
Mutante
225KQ
225ST
226KQ
226KS
228KQ
228ST
233KQ
233KS
241KQ
241KS
241Kdel
242KQ
242KS
242Kdel
225-460
225-460
226-460
226-460
228-460
228-460
233-460
233-460
241-460
241-460
241-460
242-460
242-460
242-460
K423Q
S424T
K423Q
K423S
K423Q
S424T
K423Q
K423S
K423Q
K423S
K423del
K423Q
K423S
K423del

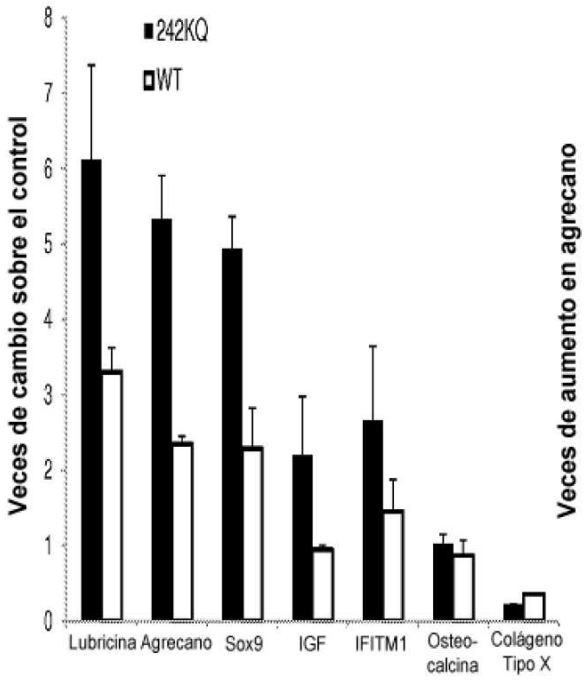
FIG. 1

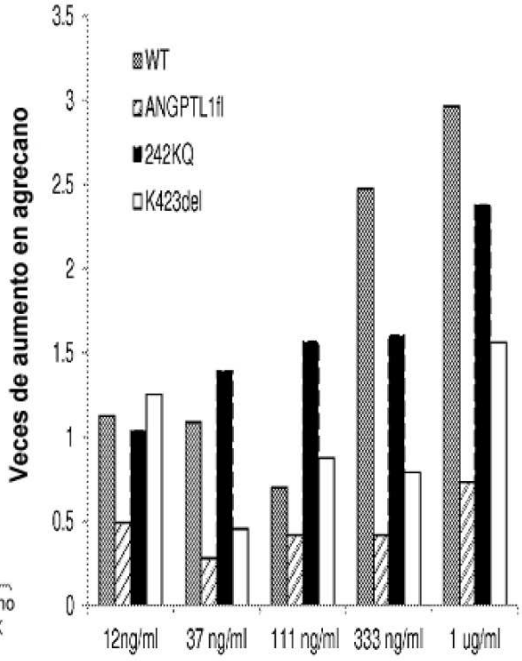
Figura 2



2A 2B 2C

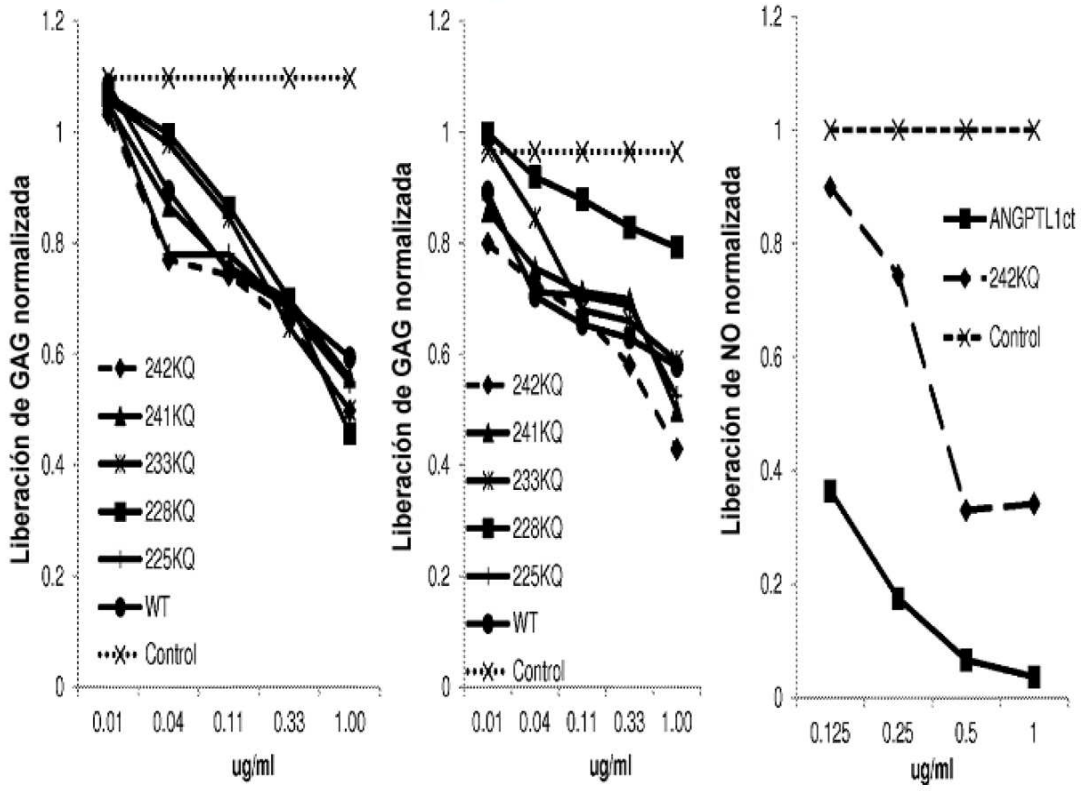
Figura 3





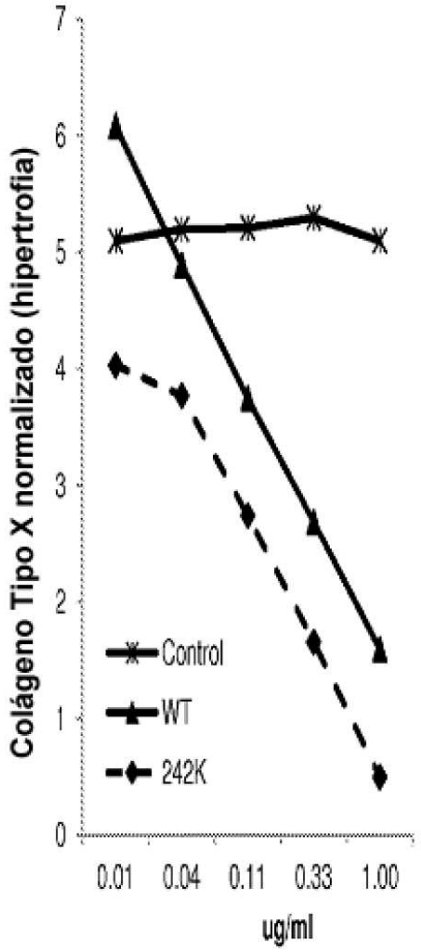
3A **3B**

Figura 4

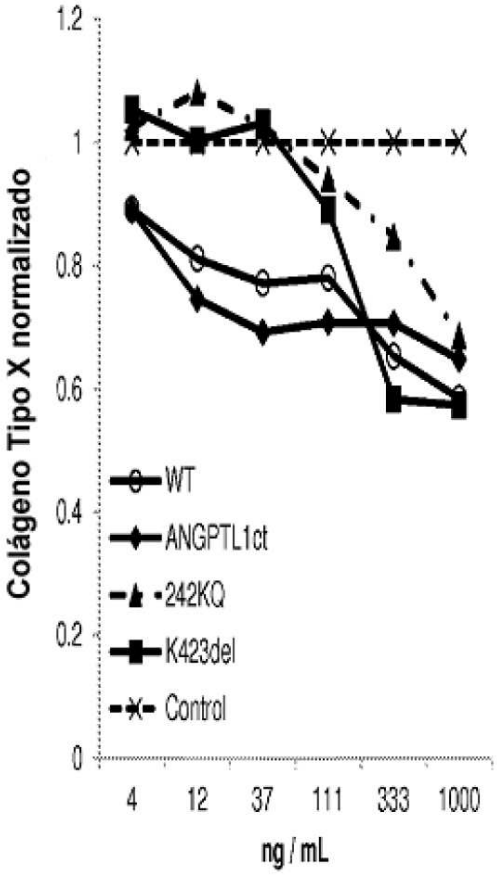


4A 4B 4C

Figura 5

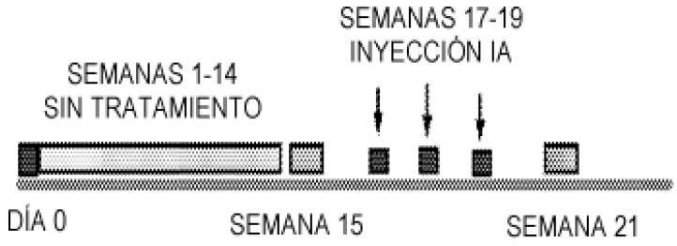


5A

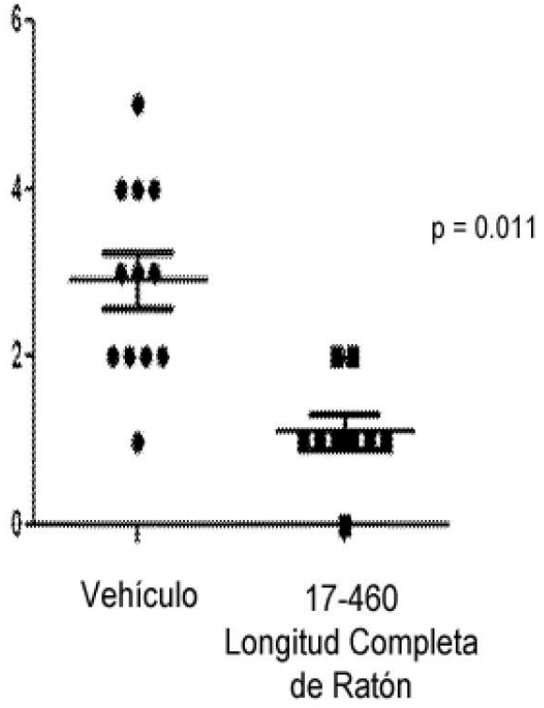


5B

Figura 6

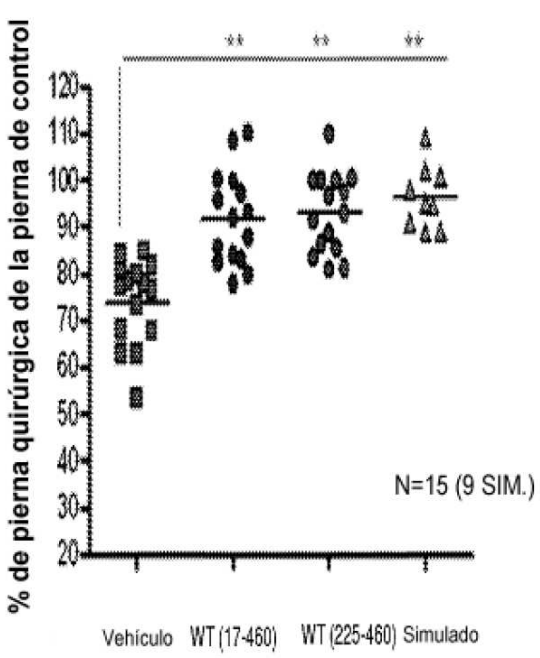


6A

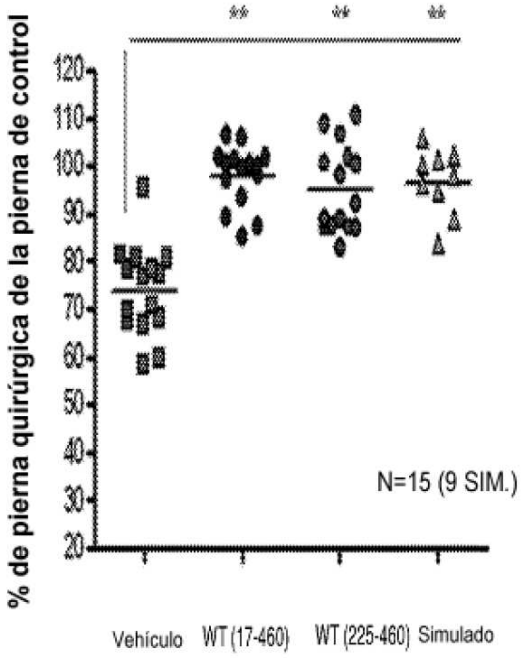


6B

Figura 7



7A



7B

Figura 8

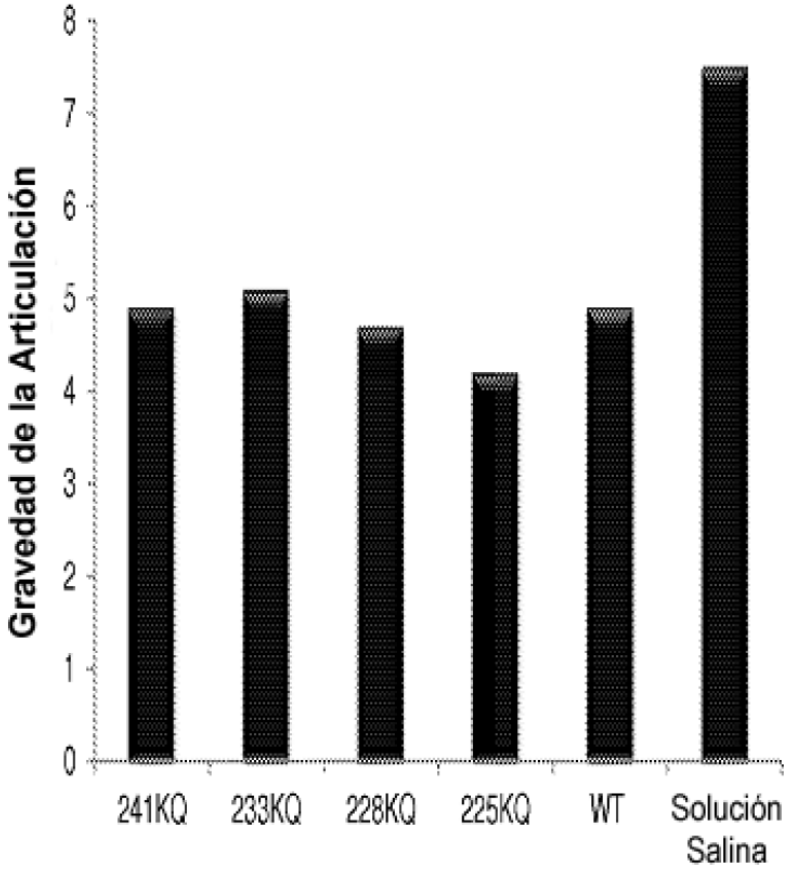
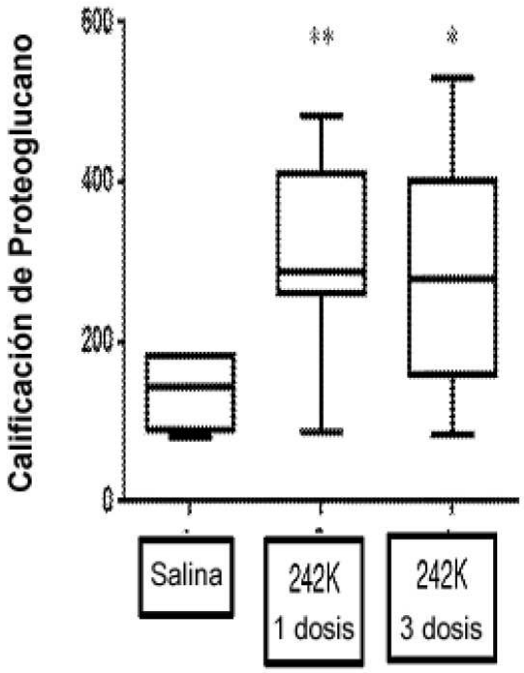
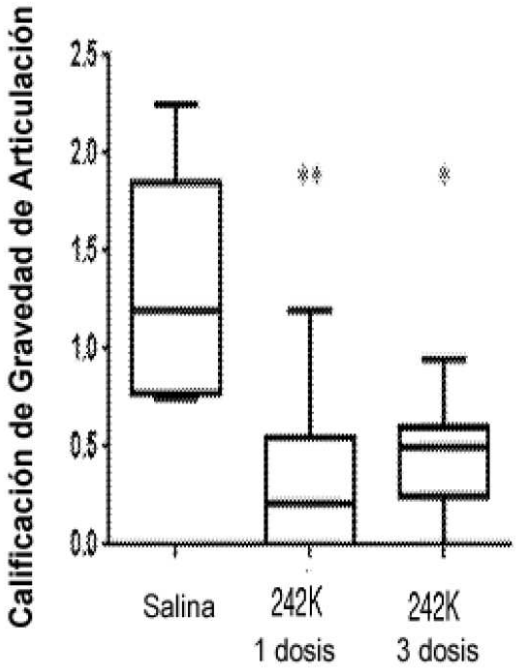

Gravedad de la Articulación
0
1
2
3
4
5
6
7
8
241KQ
233KQ
228KQ
225KQ
WT
Solución Salina

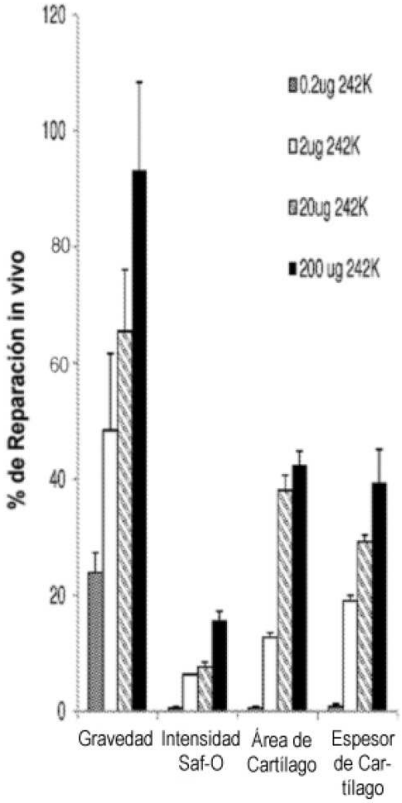
Figura 9



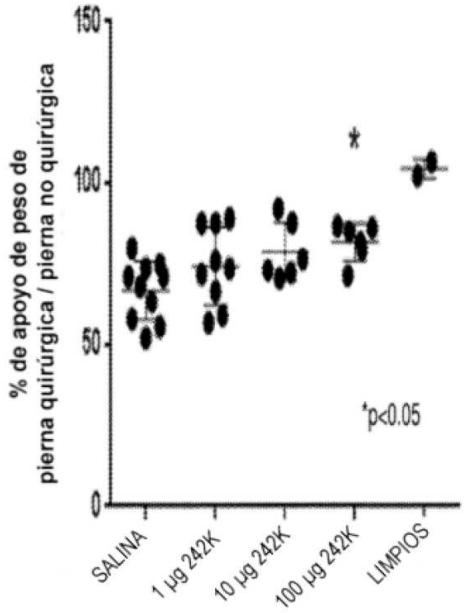


9A 9B

Figura 10

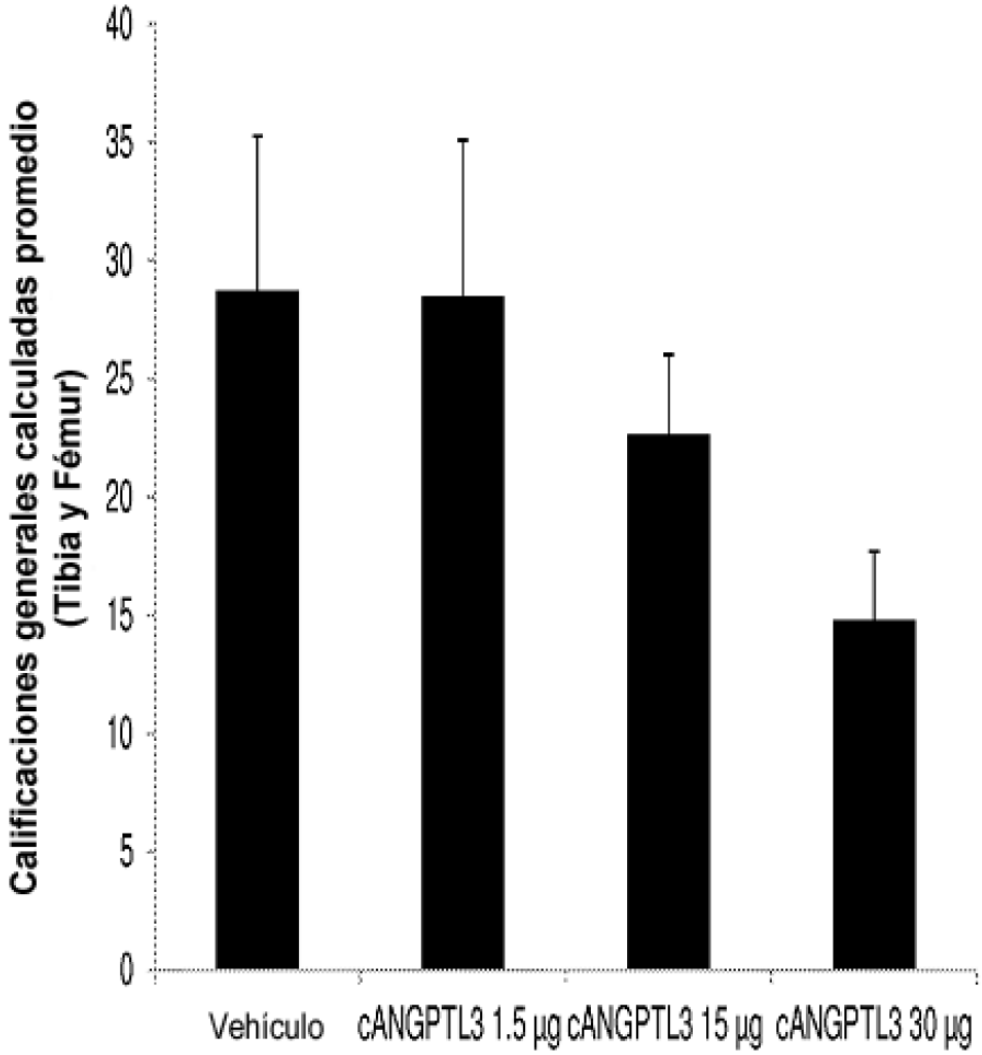


10A



10B

Figura 11


Calificaciones generales calculadas promedio
(Tibia y Fémur)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Vehículo
cANGPTL3 1.5 µg
cANGPTL3 15 µg
cANGPTL3 30 µg