

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 161**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012 PCT/US2012/069831**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13090770**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012 E 12857691 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2790717**

54 Título: **Administración de agentes terapéuticos mediante una proteína de unión a colágeno**

30 Prioridad:

**14.12.2011 US 201161570620 P**  
**09.02.2012 US 201261596869 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.01.2019**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS (25.0%)**  
**2404 North University Avenue**  
**Little Rock, AR 72207, US;**  
**THE KITASATO INSTITUTE (25.0%);**  
**MONTEFIORE MEDICAL CENTER (25.0%) y**  
**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION**  
**KAGAWA UNIVERSITY (25.0%)**

72 Inventor/es:

**SAKON, JOSHUA;**  
**PHILOMINATHAN, SAGAYA THERESA LEENA;**  
**KATIKANENI, RANJITHA;**  
**MATSUSHITA, OSAMU;**  
**PONNAPAKKAM, TULASI;**  
**KOIDE, TAKAKI;**  
**GENSURE, ROBERT C. y**  
**NISHI, NOZOMU**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 695 161 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**

Administración de agentes terapéuticos mediante una proteína de unión a colágeno

**5 Introducción**

La administración de agentes terapéuticos a los puntos del organismo de un sujeto donde se necesita un agente terapéutico concreto para que sea eficaz en un campo en desarrollo. Dichos sistemas de administración permitirán un uso más eficaz de los agentes terapéuticos, con menos toxicidad derivada de algunos agentes terapéuticos. El uso de liposomas o polipéptidos dirigidos, como los anticuerpos, para dirigir agentes terapéuticos a sitios concretos del organismo ha mostrado tener éxito, pero se necesitan agentes adicionales.

La alopecia (pérdida de cabello) es un evento perturbador tanto fisiológica como emocionalmente con múltiples causas. La alopecia se produce con mayor frecuencia en la calvicie de patrón masculino, que afecta a aproximadamente dos tercios de los varones de aproximadamente 35 años de edad; se observa un patrón de pérdida de cabello similar en mujeres con síndrome de ovarios poliquísticos. En ambos trastornos, la pérdida de cabello está mediada por andrógenos. La alopecia también se puede producir como enfermedad autoinmunitaria, denominada alopecia areata; un trastorno que afecta al 1,7 % de la población. Puede producirse como efecto secundario de tratamientos médicos, especialmente en la quimioterapia, donde un 65-85 % de los pacientes de quimioterapia experimentan algún grado de alopecia. Las consecuencias psicológicas de la pérdida de cabello se han estudiado bien en el escenario de la quimioterapia. La alopecia inducida por quimioterapia (AIQ) puede producir ansiedad, depresión, una imagen corporal negativa, una menor autoestima y una menor sensación de bienestar. De hecho, 47-58 % de las mujeres pacientes de cáncer consideran la pérdida de cabello el aspecto más traumático de la quimioterapia, y un 8 % declinaría el tratamiento por temor a la pérdida de cabello. Además de estos estudios en pacientes de quimioterapia, existen evidencias de otras formas de alopecia que respaldan la terapia para reducir las consecuencias psicológicas de la pérdida de cabello. De esta forma, sería beneficioso disponer de un nuevo tratamiento para detener la pérdida de cabello o acelerar el recrecimiento del cabello.

Aunque se han utilizado fármacos con efectos antiandrogénicos suaves (es decir, espironolactona) con un éxito limitado como terapia para la alopecia, la primera medicación eficaz para la alopecia fue minoxidil (Rogaine). Este antihipertensivo tiene un efecto secundario adverso de producir el crecimiento del cabello, y en la actualidad se utiliza como una terapia tópica para muchas formas de alopecia. Sin embargo, las respuestas son incompletas, donde algunos sujetos solamente muestran una ralentización de la pérdida de cabello en lugar de un recrecimiento real. Finasteride (Propecia) es un agente novedoso que bloquea conversión de testosterona en dihidrotestosterona, dando como resultado una mejora de la alopecia androgénica a costa de un bloqueo parcial del sistema de los andrógenos. Sin embargo, las tasas de respuesta a largo plazo (10 años) son solo de aproximadamente un 50 %. En su conjunto, a pesar de una importante investigación en este campo, sigue sin haber una terapia adecuada para la pérdida de cabello.

Además, el crecimiento del vello indeseado es una cuestión estética que muchas personas afrontan de forma regular. El vello no deseado en la cara, piernas, brazos, torso o espalda es un creciente problema cosmético. Muchas personas utilizan terapia con láser, cera u otras terapias para eliminar el vello no deseado. En la actualidad no existe ningún principio farmacéutico que limite el crecimiento del vello.

Las colagenopatías representan una gran cantidad de enfermedades en las que la formación o la estructura del colágeno no son normales. Este grupo de enfermedades da como resultado una amplia gama de síntomas entre los que se incluyen defectos óseos, defectos vasculares, y defectos en la piel. Muchas de estas enfermedades no tienen tratamiento, o los tratamientos disponibles son ineficaces.

Por ejemplo, la osteogénesis imperfecta (OI), también conocida como enfermedad de los huesos de cristal, está producida por una mutación congénita en el colágeno de tipo I. Aproximadamente de 25.000 a 50.000 estadounidenses están afectados y los efectos de la enfermedad van de leves, en los que muchas personas no son conscientes de la enfermedad, a graves, en los que las personas no pueden llevar una vida normal debido a las fracturas óseas recurrentes. La mayoría de pacientes de OI tienen una mutación que produce un cambio de aminoácido en el colágeno, que cambia una glicina por un aminoácido más voluminoso, lo que da como resultado una perturbación en la estructura de triple hélice del colágeno y una torsión deficiente. El organismo puede responder hidrolizando el colágeno, y esto puede dar como resultado una reducción en la resistencia ósea. En la actualidad no existe cura y pocos tratamientos para la OI.

**60 Sumario**

La invención proporciona una composición que comprende un segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano unido a un agonista del receptor PTH/PTHrP para su uso en un método para tratar la alopecia areata en un sujeto que necesita crecimiento del cabello que comprende administrar la composición a un sujeto para aumentar el crecimiento del cabello.

Se divulgan en el presente documento métodos para administrar agentes terapéuticos, mediante la administración de composiciones que incluyen segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano unido al agente terapéutico a los sujetos que necesitan tratamiento con el agente terapéutico. En estos métodos, el agente terapéutico no es un agonista o antagonista del receptor PTH/PTHrP, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) o factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano suministra el agente a los sitios donde el colágeno está parcialmente desenrollado o poco enrollado. También se divulgan en el presente documento métodos para tratar un sujeto con una colagenopatía, tal como osteogénesis imperfecta, mediante la administración de una composición que comprende un segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano unido a un agonista del receptor PTH/PTHrP a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar la colagenopatía, que se proporciona. El segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano suministra el agente a los sitios donde el colágeno está parcialmente desenrollado o poco enrollado.

En otro aspecto más de la presente divulgación, se proporcionan métodos para tratar el hiperparatiroidismo mediante la administración de una composición que comprende un segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano unido a un agonista del receptor PTH/PTHrP a un sujeto.

En otro aspecto adicional de la presente divulgación, se proporcionan métodos para ralentizar el crecimiento o el recrecimiento del vello tras la depilación mediante la administración de una composición que comprende un segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano unido a un agonista del receptor PTH/PTHrP a un sujeto.

En un aspecto más de la presente divulgación, se proporcionan métodos para aumentar el crecimiento del cabello o la velocidad del recrecimiento del cabello después de la pérdida o la depilación mediante la administración de una composición que comprende un segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano unido a un agonista del receptor PTH/PTHrP a un sujeto.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un alineamiento de secuencias que muestra el alineamiento de varias colagenasas bacterianas M9B procedentes de las familias de Bacillus y Clostridium. Los restos mostrados en azul son importantes para la actividad de unión del colágeno, los mostrados en verde son importantes para mantener la arquitectura o el plegado de proteína. Ambos grupos también están subrayados para las secuencias superior e inferior. Los restos mostrados en rojo son fundamentales para la unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y los de color naranja son fundamentales para colocar los residuos de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ .

La Figura 2 es un conjunto de dibujos que muestran las estructuras químicas de los péptidos sintetizados.

La Figura 3A es un gráfico que muestra el espectro de dicroísmo circular, de los péptidos colagenosos medidos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La Figura 3B es un gráfico que muestra el perfil de desnaturalización térmica de varios péptidos colagenosos. La temperatura se aumentó a una velocidad de  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

La Figura 4A es un gráfico que muestra el perfil de dispersión con la intensidad  $I(Q)$  representado gráficamente contra el vector de dispersión  $Q$ .

La Figura 4B es un gráfico que muestra la función de distribución par-distancia  $P(r)$  en el espacio real obtenido usando GNOM para el complejo  $[\text{PROXYL}-(\text{POG})_3\text{POA}(\text{POG})_6]_3:\text{CBD}$  (Rojo), complejo  $[\text{PROXYL}-(\text{POG})_4\text{POA}(\text{POG})_5]_3:\text{CBD}$  (Azul), complejo  $[\text{PROXYL}-(\text{POG})_5\text{POA}(\text{POG})_4]_3:\text{CBD}$  (Verde), complejo  $[\text{PROXYL}-(\text{POG})_6\text{POA}(\text{POG})_3]_3:\text{CBD}$  (Naranja) y complejo  $[\text{11PROXYL}-(\text{POG})_3\text{PCG}(\text{POG})_4]_3:\text{CBD}$  (Cian).

La Figura 5 es un conjunto de gráficas que muestran los datos de RMN HSQC usando las interacciones entre el dominio de unión a colágeno (CBD) - péptido colagenoso. La Figura 5A muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  del complejo  $[(\text{POG})_{10}]_3:\text{CBD}$  (verde) en una relación 1:1. La resonancia de amida de V973, G975 y S979 están presentes en esta titulación. La Figura 5B muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  del complejo  $[\text{PROXYL}-(\text{POG})_6\text{POA}(\text{POG})_3]_3:\text{CBD}$  (rojo) en una relación 1:1. Las resonancias de la amida de V973, G975 y S979 desaparecieron debido a su proximidad con el grupo de espín marcado. La Figura 5C es un diseño que muestra la estructura de y de los restos CBD que tienen la línea engrosada después de la titulación con  $[\text{PROXYL}-(\text{POG})_6\text{POA}(\text{POG})_3]_3$ .

La Figura 6 es un conjunto de gráficas que muestran los datos de RMN HSQC usando las interacciones CBD - péptido colagenoso. La Figura 6A muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  del complejo  $[(\text{POG})_{10}]_3:\text{CBD}$  (verde) en una relación 1:1. Las resonancias de la amida de Q972, V973, G975 y S979 están presentes en esta titulación. La Figura 6B muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  del complejo  $[\text{PROXYL}-(\text{POG})_5\text{POA}(\text{POG})_4]_3:\text{CBD}$  (rojo) en una relación 1:1. Las resonancias de la amida de Q972, V973, G975 y S979 tienen la línea engrosada debido al resto PROXYL. La Figura 6C es un diseño de la estructura de CBD que muestra los restos CBD que tienen la línea engrosada de forma única después de la titulación con  $[\text{PROXYL}-(\text{POG})_5\text{POA}(\text{POG})_4]_3$ . La Figura 6D muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  del complejo  $[(\text{POG})_{10}]_3:\text{CBD}$  (verde) en una relación 1:1. Las resonancias de la amida de L946, Q972, V973, G975 y S979 están presentes en esta titulación. La Figura 6E muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  del complejo  $[\text{PROXYL}-(\text{POG})_4\text{POA}(\text{POG})_5]_3:\text{CBD}$  (rojo) en una relación 1:1. Las resonancias de la amida de L946, Q972, V973, G975 y S979 desaparecieron debido a la marca de espín. La

Figura 6F muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de [(POG) $_4$ POA(POG) $_5$ ] $_3$ :CBD (cian) en una relación 1:1. En ausencia de la marca de espín, las resonancias de la amida de L946, Q972, V973, G975 y S979 no tienen la línea engrosada. La Figura 6G muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del complejo [(POG) $_{10}$ ] $_3$ :CBD (verde) en una relación 1:1. Las resonancias de la amida de L946, G953, Q972, V973, D974, G975, N976, V978, S979 están presentes durante esta titulación. La Figura 6H muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del complejo [PROXYL-(POG) $_3$ POA(POG) $_6$ ] $_3$ :CBD (rojo) en una relación 1:1. Las resonancias de la amida de L946, G953, Q972, V973, D974, G975, N976, V978, S979 tienen la línea engrosada debido al resto PROXYL. La Figura 6I es un diseño de la estructura de CBD que muestra los restos CBD que tienen la línea engrosada por la marca de espín de [PROXYL-(POG) $_3$ POA(POG) $_6$ ] $_3$ .

La Figura 7 es un conjunto de gráficas que muestran la disminución en la intensidad de (A) Q972, (B) G975, (C) S979 y (D) L924 en CBD en función de concentraciones crecientes de minicolágeno es decir [(POG) $_{10}$ ] $_3$  (negro), [PROXYL-(POG) $_6$ POA(POG) $_3$ ] $_3$ (rojo), [PROXYL-(POG) $_5$ POA(POG) $_4$ ] $_3$ (azul), [PROXYL-(POG) $_4$ POA(POG) $_5$ ] $_3$ (verde), y [PROXYL-(POG) $_3$ POA(POG) $_6$ ] $_3$ (cian).

La Figura 8 es un conjunto de gráficas que muestran los datos de RMN HSQC usando las interacciones CBD - péptido colagenoso. La Figura 8A muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del complejo [(POG) $_{10}$ ] $_3$ :CBD (verde) en una relación 1:1. Las resonancias de la amida de S906, S997 y G998 están presentes en esta titulación. La Figura 8B muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del complejo [(POG) $_4$ POA(POG) $_5$ C-PROXYL] $_3$ :CBD (rojo) en una relación 1:1. Las resonancias de la amida de S906, S997 y G998 tienen la línea engrosada debido al resto PROXYL. La Figura 8C muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de [(POG) $_4$ POA(POG) $_5$ C-carbamidometil] $_3$ :CBD (cian) en una relación 1:1. En ausencia de la marca de espín, las resonancias de la amida de S906, S997 y G998 no tienen la línea engrosada. La Figura 8D es un diseño de la estructura de CBD que muestra los restos CBD que tienen la línea engrosada debido a la marca de espín de [(POG) $_4$ POA(POG) $_5$ C-PROXYL] $_3$ . Las resonancias de la amida de S906, S997 y G998 (rojo) desaparecieron tras titulación con [(POG) $_4$ POA(POG) $_5$ -PROXYL] $_3$ . La Figura 8E muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del complejo [(POG) $_{10}$ ] $_3$ :CBD (verde) en una relación 1:1. Las resonancias de la amida de S906, Q972, V973, G975, S979, S997 y G998 están presentes en esta titulación. La Figura 8F muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del complejo [11PROXYL-(POG) $_3$ PCG(POG) $_4$ ] $_3$ :CBD (rojo) en una relación 1:1. Las resonancias de la amida de S906, Q972, V973, G975, S979, S997 y G998 desaparecieron debido a la marca de espín. Figure 8G muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de CBD (negro) y del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de [(POG) $_3$ PCG(POG) $_4$ ] $_3$ :CBD (cian) en una relación 1:1. Las resonancias de S906, Q972, V973, G975, S979, S997 y G998 están intactas en ausencia de la marca de espín. La Figura 8H es un diseño de la estructura de CBD que muestra los restos que tienen la línea engrosada de forma única después de la titulación con [11PROXYL-(POG) $_3$ PCG(POG) $_4$ ] $_3$ . Solamente las resonancias de amida de S906, R929, S997, y G998 (rojo) desaparecieron en la relación 0,2:1. Cuando la relación del péptido aumentó hasta 0,3:1, las resonancias adicionales de V973, G975, S979 (azul) desaparecieron.

La Figura 9 es un conjunto de dibujos de estructura derivados de los perfiles de dispersión SAXS usando cálculos de hibridación simulada *ab initio* para (A) complejo [PROXYL-(POG) $_3$ POA(POG) $_6$ ] $_3$ :CBD, (B) complejo [PROXYL-(POG) $_4$ POA(POG) $_5$ ] $_3$ :CBD, (C) complejo [PROXYL-(POG) $_5$ POA(POG) $_4$ ] $_3$ :CBD y (D) complejo [PROXYL-(POG) $_6$ POA(POG) $_3$ ] $_3$ :CBD, (E) complejo [(POG) $_4$ POA(POG) $_5$ C-PROXYL] $_3$ :CBD, (F) [(POG) $_4$ POA(POG) $_5$ C-carbamidometil] $_3$ :CBD. Los sitios de la mutación Gly $\rightarrow$ Ala están destacados. Las Figuras 9G y 9H muestran dos modos de unión probables del complejo [11PROXYL-(POG) $_3$ PCG(POG) $_4$ ] $_3$ :CBD.

La Figura 10 es un conjunto de gráficas que muestran los datos de RMN HSQC usando las interacciones CBD - péptido colagenoso. Figure 10A es una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de [POGPO- $^{15}\text{N}$ -G-(POG) $_8$ ] $_3$  (negro) con el espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del complejo [POGPO- $^{15}\text{N}$ -G-(POG) $_8$ ] $_3$ :CBD (rojo) en una relación 1:1. La Figura 10B muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de [POGPO- $^{15}\text{N}$ -G-(POG) $_2$ -POA(POG) $_5$ ] $_3$  (negro) con el espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del complejo [POGPO- $^{15}\text{N}$ -G-(POG) $_2$ -POA(POG) $_5$ ] $_3$ :CBD (rojo) en una relación 1:1. La Figura 10C muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de [(POG) $_8$ -PO- $^{15}\text{N}$ -G-POG] $_3$  (negro) con el espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del complejo [(POG) $_8$ -PO- $^{15}\text{N}$ -G-POG] $_3$ :CBD (rojo) en una relación 1:1. La Figura 10D muestra una superposición del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de [(POG) $_4$ -POA-PO- $^{15}\text{N}$ -G-POG] $_3$  (negro) con el espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  del complejo [(POG) $_4$ -POA-PO- $^{15}\text{N}$ -G-POG] $_3$ :CBD (rojo) en una relación 1:1.

La Figura 11 muestra la distribución en el tejido de S $^{35}$ -PTH-CBD 1 hora y 12 horas después de la inyección subcutánea. Destacar el perfilado de la piel.

La Figura 12 es un conjunto de fotografías que documentan el crecimiento del cabello en la espalda de ratones en el día 36 después de la depilación, grupos de tratamiento como se indica (Antagonista = PTH(7-33)-CBD, Agonista = PTH-CBD).

La Figura 13 es un conjunto de fotografías que muestran la histología en el Día 36 después del tratamiento indicado. Se tomaron muestras de piel de la región dorsal, que se procesaron para su tinción mediante hematoxilina y eosina (H&E). Se muestran secciones representativas de cada grupo de tratamiento como se indica. (Antagonista = PTH(7-33)-CBD, Agonista = PTH-CBD).

La Figura 14 es un gráfico que muestra el recuento de folículos pilosos según campo alto potenciado. Los folículos pilosos en fase anágena VI se contaron por dos observadores independientes de manera enmascarada. Los resultados se expresan como promedio +/- desviación estándar. \*\*= $p < 0,01$  vs. sin quimio ANOVA seguido por la

prueba de Dunnett. (Antagonista = PTH(7-33)-CBD, Agonista = PTH-CBD).

La Figura 15 es un conjunto de fotografías que muestran el crecimiento del pelo en la espalda de los ratones después de cada uno de los tratamientos indicados y un gráfico que muestra los resultados de un análisis mediante escala de grises del cabello en el sitio de inyección con el tiempo después de la inyección.

5 La Figura 16 es un conjunto de fotografías que muestran el pelo de la espalda de los ratones después del tratamiento indicado sin depilación anterior.

La Figura 17 es un conjunto de fotografías y un gráfico que muestran el análisis en escala de grises del crecimiento de pelo en la espalda de los ratones que comparan los tratamientos indicados con el PTH-CBD administrado antes de la quimioterapia en contraposición a después de comenzar la quimioterapia.

10 La Figura 18 es una fotografía de tres ratones 13 días después de la aplicación de cera para eliminar el pelo y el tratamiento con PTH-CBD, PTH antagonista-CBD o vehículo solo.

La Figura 19 es un conjunto de fotografías de ratones que muestran el crecimiento del cabello en un modelo de alopecia areata después del tratamiento con un control o con PTH-CBD.

15 La Figura 20 es un gráfico que muestra los niveles de hormona paratiroidea en ratas envejecidas ovariectomizadas que recibieron una inyección con una sola dosis de PTH-CBD humano 6 meses antes del sacrificio.

### Descripción detallada

20 Se proporcionan en el presente documento métodos para suministrar un agente terapéutico mediante la administración de una composición que comprende un segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano unido a un agente terapéutico a un sujeto que necesita tratamiento con el agente terapéutico. En esta realización, el agente terapéutico no es un agonista o antagonista del receptor PTH/PTHrP, u no es un polipéptido bFGF o EGF. El segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano suministra el agente terapéutico a los sitios donde el colágeno está parcialmente desenrollado o poco enrollado. La presente invención se define en las reivindicaciones.

25 Además, se proporcionan métodos para tratar colagenopatías, tales como la osteogénesis imperfecta (OI), mediante la administración de una composición que comprende un segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano unido a un agonista del receptor PTH/PTHrP a un sujeto que necesita tratamiento para la colagenopatía. Las colagenopatías incluyen aunque no de forma limitativa osteogénesis imperfecta, síndrome de Stickler, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Alport, enfermedad de Caffey, y daños localizados en el colágeno o en el cartílago. Muchas de estas enfermedades están causadas por defectos genéticos que dan como resultado que el colágeno de algunos tejidos quede poco enrollado o parcialmente enrollado.

30 Por ejemplo, los individuos con OI tienen una mutación que produce un cambio de aminoácido en el colágeno, que cambia una glicina por un aminoácido más voluminoso, lo que da como resultado una perturbación en la estructura de triple hélice del colágeno y una torsión deficiente del colágeno. En los Ejemplos, los inventores demuestran que los polipéptidos bacterianos de unión a colágeno descritos en el presente documento se dirigen y se unen a estas zonas de colágeno poco enrollado. Por lo tanto, el uso de los polipéptidos de unión a colágeno descritos en el presente documento para administrar un agente terapéutico capaz de tratar la OI a los sitios del colágeno poco enrollado puede permitir un tratamiento más eficaz.

35 El segmento de polipéptido de unión a colágeno y el agente terapéutico pueden reticularse químicamente entre sí o pueden ser porciones polipeptídicas de una proteína de fusión. Las expresiones "proteína de fusión" y "polipéptido de fusión" se pueden utilizar para referirse a un único polipéptido que comprende dos segmentos funcionales, por ejemplo, un segmento de polipéptido de unión a colágeno y un agente terapéutico de tipo polipéptido, tal como un segmento polipeptídico de un receptor PTH/PTHrP. Las proteínas de fusión pueden tener cualquier tamaño, y el único polipéptido de la proteína de fusión puede encontrarse en una forma multimérica en su estado funcional, por ejemplo, mediante una conexión de disulfuro de cisteína de dos monómeros del polipéptido único. Un segmento polipeptídico puede ser un polipéptido sintético o un polipéptido de origen natural. Dichos polipéptidos pueden ser una porción de un polipéptido o pueden comprender una o más mutaciones. Los dos segmentos polipeptídicos de las proteínas de fusión pueden unirse directa o indirectamente. Por ejemplo, los dos segmentos pueden unirse directamente mediante, por ejemplo, un enlace peptídico o reticulación química, o indirectamente, a través de, por ejemplo, un segmento enlazador o polipéptido enlazador. El enlazador peptídico puede tener cualquier longitud y puede incluir aminoácidos tradicionales y no tradicionales. Por ejemplo, el enlazador peptídico puede tener 1-100 aminoácidos de longitud, de forma adecuada tiene 5, 10, 15, 20, 25 o más aminoácidos de longitud de tal forma que la porción de unión a colágeno del polipéptido de fusión puede mediar en la unión de colágeno y el agente terapéutico puede tener su efecto terapéutico. Los enlazadores peptídicos pueden incluir aunque no de forma limitativa un dominio PKD (enfermedad del riñón poliquístico) procedente de una colagenasa u otra proteína tal como en la SEQ ID NO: 2, un GST o etiqueta His, o un enlazador Ser o Gly.

40 El segmento polipeptídico de unión a colágeno es un polipéptido que se une al colágeno y puede ser parte de una proteína de fusión más grande, agente bioactivo, o agente farmacéutico. La determinación de si una composición, segmento polipeptídico, proteína de fusión, o agente farmacéutico o bioactivo, se une al colágeno, se puede llevar a cabo como se describe en la publicación de patente estadounidense n.º 2010/0129341. Brevemente, Se incuba con colágeno en tampón de unión, y la mezcla se filtra a continuación a través de un filtro que permitiría que pasara a su través, pero que bloquea el colágeno y por lo tanto retiene los materiales que se unan al colágeno. A continuación, el

filtrado se analiza para determinar la presencia de la composición, segmento polipeptídico, proteína de fusión, o agente farmacéutico o bioactivo. De manera adecuada, al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o de forma más adecuada al menos un 99 % de la composición de unión a colágeno, segmento polipeptídico, proteína de fusión, o agente farmacéutico o bioactivo queda retenido por el filtro en este ensayo, en comparación a cuando la filtración se realiza sin colágeno.

El segmento polipeptídico de unión a colágeno puede ser un segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano. Puede ser un segmento polipeptídico de unión a colágeno de *Clostridium*. El segmento polipeptídico de unión a colágeno puede ser un segmento de una colagenasa, o una colagenasa bacteriana, o una colagenasa de *Clostridium*. De forma adecuada, el segmento polipeptídico es solamente una parte de la colagenasa y el segmento polipeptídico de unión a colágeno no tiene actividad colagenasa. El polipéptido de unión a colágeno puede ser una proteína de unión a colágeno M9B bacteriana (incluidas las derivadas de *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp.) o una M9A (incluidas las derivadas de *Vibrio* spp.), o un péptido de unión a colágeno derivado de dicha proteína. Por "derivada de", los autores entienden que el péptido es un fragmento de la proteína de longitud completa, un péptido que tiene cambios en los aminoácidos con respecto a la proteína natural o una combinación de los mismos. La clave es que el péptido retiene la capacidad de unirse al colágeno. Por ejemplo, un péptido se puede derivar de una proteína seleccionando una región de la proteína capaz de unirse al colágeno. Las composiciones que incluyen una colagenasa bacteriana como péptido de unión al colágeno se describen en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2010/0129341.

La Figura 1 muestra un alineamiento de secuencias de la región de unión al colágeno de varias proteína de unión a colágeno M9B de origen bacteriano como las SEQ ID NOs: 13-34. Como se puede observar en el alineamiento de secuencias, estas proteínas tienen una cantidad relativamente pequeña de identidad de secuencia (aproximadamente un 30 %), pero todas ellas se unen al colágeno de una forma similar y se cree que tienen similar conformación como se analiza en los Ejemplos. Así, cualesquiera de los péptidos mostrados en la Figura 1 o fragmentos de unión a colágeno de los mismos se pueden usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento. En la Figura 1, los restos de aminoácidos fundamentales para la conformación del péptido y para la actividad de unión a colágeno están subrayados y se muestran en color verde y azul, respectivamente. Los restos de aminoácidos clave para la unión al colágeno son una tirosina o fenilalanina en la posición 970 de ColG, la posición 977 de la secuencia ColH de la SEQ ID NO: 1 (posición 937 en la Figura 1) o una posición similar en una de las secuencias mostradas en la Figura 1; una tirosina en la posición 994 de ColG, la posición 1000 de la secuencia ColH de la SEQ ID NO:1 (posición 962 de la Figura 1) o una posición similar en una de las secuencias mostradas en la Figura 1; una tirosina, fenilalanina o histidina en la posición 996 de ColG, posición 1002 de la secuencia ColH de la SEQ ID NO:1 (posición 964 de la Figura 1) o una posición similar en una de las secuencias mostradas en la Figura 1. Así, un péptido con una identidad de secuencia relativamente baja, que comparte la estructura y función de la proteína ColG también se puede usar como dominio de unión al colágeno (CBD) del presente documento.

En una realización, la colagenasa es ColH, SEQ ID NO: 6. El segmento polipeptídico de unión a colágeno puede ser o puede incluir los restos 901-1021 de la SEQ ID NO:6 (restos 34-158 de la SEQ ID NO:1), o un fragmento de los restos 34-158 de la SEQ ID NO:1 de al menos 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 o 120 aminoácidos de longitud. El segmento polipeptídico de unión a colágeno es al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o al menos un 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos 98 %, o al menos un 99 % idéntico a los restos 34-158 de la SEQ ID NO: 1. El segmento polipeptídico de unión a colágeno puede ser o puede incluir los restos 807-1021 de la SEQ ID NO:6 (restos 37-251 de la SEQ ID NO:2), o un fragmento de los restos 807-1021 de la SEQ ID NO:6 de al menos 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 o 120 aminoácidos de longitud. Los restos 807-901 comprenden el dominio de la enfermedad del riñón poliquístico (PKD) de la proteína de unión a colágeno. Los expertos en la materia apreciarán que se podrían utilizar otros enlazadores para unir el péptido de unión al colágeno a un agente terapéutico, como se resalta anteriormente. El segmento polipeptídico de unión a colágeno puede ser o puede comprender un fragmento de los restos 901-1021 de la SEQ ID NO:6, por ejemplo, un fragmento de al menos 8, al menos 10, al menos 20, a menos 30, al menos 40, o al menos 50 restos de aminoácidos consecutivos de los restos 901-1021 de la SEQ ID NO:6. De forma adecuada, el polipéptido de unión a colágeno consiste en los restos 894-1008, 894-1021, 901-1021, o 901-1008 de la SEQ ID NO: 6 o un homólogo de la misma como se muestra mediante el alineamiento de secuencias de la Figura 9.

Entre otras proteínas, el segmento de unión a colágeno se puede derivar de ColG (Matsushita et al., (1999) J. Bacteriol. 181:923-933), una colagenasa de clase I procedente de *Clostridium histolyticum*. ColH es una colagenasa de clase II (Yoshihara et al., (1994) J. Bacteriol. 176: 6489- 6496). El segmento polipeptídico de unión a colágeno también puede ser un fragmento polipeptídico procedente de una cualquiera de las secuencias de proteínas proporcionadas en la Figura 1 que se alinea con los péptidos de unión al colágeno de *Clostridium* y *Bacillus*. Los expertos en la técnica apreciarán que otros miembros de esta familia de proteínas de unión al colágeno puede ser de utilidad en los métodos descritos en el presente documento.

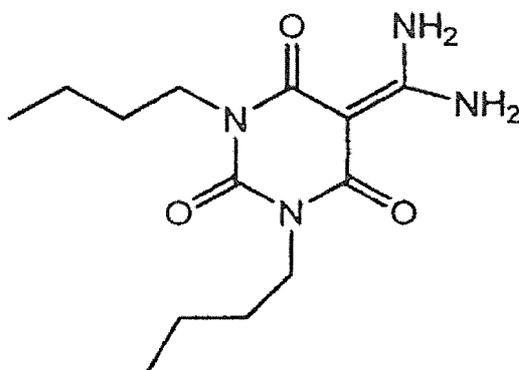
Los agentes terapéuticos unidos al polipéptido de unión a colágeno pueden ser cualquier principio farmacéutico o cualquier otro principio activo adecuado, incluidos, aunque no de forma limitativa, promotores osteogénicos, antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, polipéptidos tales como proteínas recombinantes, citoquinas o anticuerpos, sustancias químicas de molécula pequeña, o cualquier combinación de los mismos. De manera adecuada, los agentes

- 5 terapéuticos son capaces de promover el crecimiento del hueso, disminuir la inflamación, promover la estabilidad del colágeno. De manera adecuada, el agente terapéutico es uno de aquellos que tienen efecto terapéutico en la región del colágeno o del colágeno dañado. El agente terapéutico puede incluir, aunque no de forma limitativa, proteína morfogénica ósea (BMP), G-CSF, FGF, BMP-2, BMP-3, FGF-2, FGF-4, anticuerpo contra la esclerosina, hormona de crecimiento, IGF-1, VEGF, TGF- $\beta$ , KGF, FGF-10, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, receptor TGF- $\beta$ , CT, GH, GM-CSF, EGF, PDGF, celiprolol, activinas, y factores de crecimiento del tejido conectivo. En realizaciones alternativas, el principio activo puede ser un agonista o antagonista del receptor PTH/PTHrP.
- 10 La pérdida de hueso debido a una colagenopatía tal como osteogénesis imperfecta, síndrome de Stickler u otros, que ponen a una persona en riesgo elevado de una fractura de hueso debido a un defecto en el colágeno se podría tratar mediante la administración de un péptido anabólico del hueso. El CBD puede dirigir los agentes anabólicos del hueso a los sitios donde el colágeno está incorrectamente formado y, de esta forma, puede prevenir la fractura.
- 15 La fragilidad vascular debido a defectos tal como el síndrome de Ehlers-Danlos de tipo IV, síndrome de Alport, u otras enfermedades donde la rotura de los vasos sanguíneos es más probable debido a un defecto en la formación de colágeno, se pueden administrar péptidos que estimulan el crecimiento o la reparación vascular. El CBD dirigirá el péptido a las zonas con el colágeno dañado y es probable que estas áreas tengan vasos dañados. Los agentes terapéuticos estimularán el crecimiento y la reparación en el sitio del daño y evitarán la rotura de los vasos.
- 20 La fragilidad de la piel debida a trastornos tales como el síndrome de Ehlers-Danlos, enfermedad de Caffey u otras enfermedades donde el debilitamiento de la piel debido a un defecto del colágeno produce hiperelasticidad, formación rápida de hematomas o mala cicatrización de heridas. Los factores de crecimiento dérmicos y epidérmicos pueden servir como agentes terapéuticos que cuando se unen al CBD y se administran a las zonas con el colágeno dañado estimularán el crecimiento y la reparación de la piel, evitando las estrías y mejorando la cicatrización.
- 25 Los defectos del colágeno también pueden producir malformación o insuficiencia del cartílago. Los factores de crecimiento del cartílago se podrían administrar localmente a los sitios con el cartílago dañado para ayudar en la reparación y restaurar la función.
- 30 El segmento polipeptídico agonista del receptor PTH/PTHrP puede ser un polipéptido sintético o un polipéptido de origen natural. Dichos polipéptidos pueden ser una porción de un polipéptido o pueden comprender una o más mutaciones. Las mutaciones pueden convertir el agonista del receptor PTH/PTHrP en un agonista mejor o peor, en comparación con el PTH/PTHrP natural. La actividad agonista con el receptor PTH/PTHrP se puede someter a ensayo como se describe en el Ejemplo 3, más adelante, mediante un ensayo de estimulación de AMPc. Un agonista estimulará la síntesis de AMPc en el ensayo descrito. De manera adecuada, un agonista puede activar la actividad del receptor en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o incluso un 110 % o 120 % de lo que haría el PTH(1-34) natural.
- 35 El segmento polipeptídico agonista del receptor PTH/PTHrP es un segmento polipeptídico PTH o PTHrP. Una isoforma humana de PTH es la SEQ ID NO:7. Una isoforma humana de PTHrP es la SEQ ID NO:8. Aunque se proporcionan isoformas humanas, los expertos en la materia apreciarán que también se pueden utilizar otras isoformas no derivadas de seres humanos. Dichas isoformas no derivadas de seres humanos pueden ser capaces de interactuar con el receptor PTH/PTHrP y viceversa. El segmento polipeptídico agonista del receptor PTH/PTHrP puede ser o puede incluir los restos 1-33 de la SEQ ID NO:1 (restos 1- 33 de PTH (SEQ ID NO:7)). El segmento polipeptídico agonista del receptor PTH/PTHrP puede ser o puede incluir los restos 1-34 de PTH (SEQ ID NO:7). En otras realizaciones, es un fragmento de los restos 1-34 de PTH (SEQ ID NO:7). En otras realizaciones, el segmento polipeptídico agonista del receptor PTH/PTHrP puede ser o puede incluir los restos 1-84 de PTH (SEQ ID NO:7). En otras realizaciones, el segmento polipeptídico agonista del receptor PTH/PTHrP puede ser o puede incluir los restos 1-14 de PTH (SEQ ID NO:7). En otras realizaciones adicionales, el agonista del receptor PTH/PTHrP es un segmento polipeptídico de PTH o PTHrP de cualquier otra especie.
- 40 El antagonista del receptor PTH/PTHrP puede incluir en una realización PTH(7-34), es decir, los restos 7-34 de PTH (SEQ ID NO:7). En otra realización, es, o incluye, los restos 7-33 de PTH (SEQ ID NO:7). En otras realizaciones, es un fragmento o los restos 7-34 de la SEQ ID NO: 8. En otra realización, el antagonista del receptor PTH/PTHrP incluye PTH(7-14), es decir, los restos 7-14 de PTH (SEQ ID NO:7). En otra realización, los antagonistas del receptor PTH/PTHrP incluyen ((-1)-33) de PTH/PTHrP. En otra realización, los antagonistas del receptor PTH/PTHrP incluyen los restos 1-14 de PTH con una extensión en el extremo N. La adición de una extensión en el extremo N a PTH o fragmentos activos en el extremo N de PTH convierte los péptidos PTH en antagonistas. La extensión en el extremo N puede tener 1, 2, 3, 4, 5, o más aminoácidos de longitud. La identidad de los aminoácidos de la extensión del extremo N no suele ser importante. En una realización, el antagonista del receptor PTH/PTHrP incluye los restos 1-33 de PTH con una extensión Gly-Ser en el extremo N (SEQ ID NO:11). En otra realización, el antagonista del receptor PTH/PTHrP incluye PTHrP(7-34), es decir, los restos 7-34 de la SEQ ID NO:8, o un fragmento de los restos 7-34 de la SEQ ID NO:8. En otra realización, el antagonista del receptor PTH/PTHrP incluye TIP(7-39) de ratón (véase Hoare S R, Usdin T B. 2002. Specificity and stability of a new PTH1 receptor antagonist, mouse TIP(7-39). Peptides 23:989-98.). Otros antagonistas del receptor PTH/PTHrP que se pueden utilizar en las proteínas de fusión también se divulgan en Hoare et al. El antagonista del receptor PTH/PTHrP puede ser un fragmento de al menos 8, 10, 12 o más
- 55
- 60
- 65

aminoácidos procedentes de los restos 1-34 de la SEQ ID NO:7. En otras realizaciones, el antagonista del receptor PTH/PTHrP puede ser el polipéptido antagonista del receptor PTH/PTHrP procedente de otra especie.

En una realización, el agente terapéutico o el antagonista del receptor PTH/PTHrP o el segmento polipeptídico antagonista está en el extremo N con respecto al segmento polipeptídico de unión a colágeno de la proteína de fusión. Es decir, cada uno de los dos segmentos polipeptídicos tiene un extremo N y un extremo C, y el extremo N del segmento polipeptídico de unión a colágeno está unido directa o indirectamente, por ejemplo, mediante un segmento polipeptídico enlazador (tal como un enlazador de PKD, glicina o serina) con el extremo C del agente terapéutico o segmento polipeptídico agonista o antagonista de PTH/PTHrP.

Las proteínas de fusión anteriormente descritas que comprenden (a) un segmento polipeptídico de unión a colágeno unido a (b) un agente terapéutico o un segmento polipeptídico agonista o antagonista de PTH/PTHrP se pueden sustituir por agentes farmacéuticos que comprenden (a) un segmento polipeptídico de unión a colágeno unido a (b) un agente terapéutico o agonista del receptor PTH/PTHrP o un agonista del receptor PTH/PTHrP no peptídico. Un ejemplo de un agonista del receptor PTH/PTHrP no peptídico es el compuesto AH3960 (Rickard et al., (2007) Bone 39:1361-1372).



AH3960

AH3960 contiene dos grupos amino. Los grupos amino de moléculas químicas pequeñas tales como AH3960 se pueden usar para reticular el agente terapéutico a los grupos amino del segmento polipeptídico de unión a colágeno mediante un reticulante tal como DSG (glutarato de disuccinimidilo) o mediante una combinación de SANH (succinimidil-4-hidrazinonicotinato acetona hidrazona) y SFB (benzoato de succinimidil-4-formilo). Los agentes terapéuticos se pueden reticular por su grupo amino a un grupo carboxilo del segmento polipeptídico de unión a colágeno mediante EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida) o viceversa. Estos productos de reticulación están disponibles de Pierce (piercenet.com, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Ill.). Los protocolos y las condiciones de reacción también están disponibles en la bibliografía del producto de Pierce (piercenet.com).

En otra realización de los agentes farmacéuticos que comprenden (a) un segmento polipeptídico de unión a colágeno; unido a (b) un agente terapéutico polipeptídico o un segmento polipeptídico agonista o antagonista de PTH/PTHrP, el segmento (a) y el segmento (b) son polipéptidos independientes, y los dos polipéptidos están unidos mediante reticulación química. Los dos polipéptidos pueden estar reticulados mediante grupos amino por reactivos que incluyen DSG (glutarato de disuccinimidilo) o glutaraldehído. También se pueden reticular mediante grupos amino mediante derivatización de un polipéptido con SANH (succinimidil-4-hidrazinonicotinato acetona hidrazona) y el otro con SFB (benzoato de succinimidil-4-formilo), y mezclando después ambos polipéptidos derivatizados para su reticulación. Los dos polipéptidos se pueden reticular entre un grupo amino de un polipéptido y un carboxilo del otro mediante reacción con EDC (clorhidrato de (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida). Los polipéptidos también se pueden reticular (por ejemplo, acoplarse covalentemente) mediante cualquier otro método adecuado conocido de una persona normalmente experta en la materia. Estos reactivos de reticulación están disponibles de Pierce (piercenet.com, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Ill.). Los protocolos y las condiciones de reacción también están disponibles en la bibliografía del producto de Pierce (piercenet.com). Estos y otros métodos de reticulación aplicables se describen en las solicitudes publicadas de patente de Estados Unidos 2006/0258569 y 2007/0224119.

En el presente documento también se proporcionan métodos para tratar el hiperparatiroidismo mediante la administración de PTH-CBD a un sujeto que necesita tratamiento para el hiperparatiroidismo. En una realización, la PTH administrada a un sujeto puede ser una PTH de una especie diferente. Como se muestra en los Ejemplos, la única administración de CBD-PTH a ratas envejecidas ovariectomizadas puede reducir la cantidad de PTH endógena producida por el animal. Por lo tanto, la administración de PTH-CBD a personas que padecen hiperparatiroidismo puede producir una disminución de los síntomas asociados con el hiperparatiroidismo y tener niveles menores de PTH después de la administración de PTH-CBD.

Los efectos de los agonistas y antagonistas de PTH sobre el crecimiento del cabello se han estudiado durante al menos 15 años. La PTH tiene un receptor común con el péptido relacionado con PTH (PTHrP), que normalmente está producido por los fibroblastos dérmicos. PTHrP afecta la proliferación y diferenciación de los queratinocitos, y modula el ciclo del cabello. La mayoría de los ensayos realizados sobre los efectos de crecimiento del cabello se han realizado con antagonistas de PTH, donde las indicaciones de los ensayos iniciales eran que estos eran los agentes más eficaces. Las formulaciones tanto inyectadas como tópicas se han sometido a ensayo en modelos animales de alopecia inducida por quimioterapia y en el ratón SKH-1 sin pelo. Parte del efecto de los antagonistas de PTH sobre el crecimiento del cabello es la transición de los folículos pilosos a un estado catágeno distrófico, que los protege de daños derivados de la quimioterapia. Sin embargo, los ensayos clínicos con antagonistas de PTH por vía tópica para la alopecia inducida por quimioterapia realizados por IGI Pharmaceuticals se interrumpieron en la Fase 2 debido a su eficacia limitada. Por tanto, se necesitan nuevas composiciones contra la alopecia.

Los problemas de administración y retención de PTH a la piel se pueden superar usando análogos de PTH dirigidos al colágeno. Para conseguir esto, los inventores sintetizaron varias proteínas de fusión con diferentes agonistas y antagonistas de PTH enlazados a un dominio de unión a colágeno derivado de la colagenasa ColH1 de *Clostridium histolyticum*. En los estudios descritos en los Ejemplos, los inventores descubrieron que el compuesto agonista PTH-CBD fomenta la transición de los folículos pilosos a la fase anágena, y tiene efectos potentes sobre el crecimiento del cabello. El compuesto antagonista PTH(7-33)-CBD tiene poco efecto sobre el crecimiento del cabello en modelos de quimioterapia, y tiene un efecto perjudicial sobre el recrecimiento del vello después de la depilación. Compuestos tales como PTH-CBD, que fomentan la transición de los folículos pilosos a la fase anágena, han sido muy deseados debido a su potencial para tratar una gran variedad de trastornos de pérdida de cabello. PTH-CBD parece tener un mecanismo de acción similar a la ciclosporina, que también fomenta la transición de los folículos pilosos a la fase anágena, aunque es menor probable que el mecanismo sea el resultado de efectos directos sobre la señalización de WNT. Aunque el uso clínico de la ciclosporina con este fin está limitado por toxicidad sistémica, PTH-CBD no ha mostrado efectos tóxicos, incluso con administración sistémica.

Por tanto, en otro aspecto, se proporcionan en el presente documento métodos para aumentar el crecimiento del cabello. Los métodos incluyen, administrar un CBD unido a un agonista del receptor PTH/PTHrP a un sujeto que necesita tratamiento para inducir el crecimiento del cabello o detener la caída del cabello. El método es aplicable a personas con alopecia, incluida la alopecia inducida por quimioterapia, pero también alopecia areata, alopecia causada por calvicie de patrón masculino, síndrome de ovario poliquístico y otras pérdidas del cabello. Las composiciones pueden administrarse de forma local o tópica para tratar la pérdida de cabello.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para ralentizar el crecimiento o el recrecimiento del vello después de un procedimiento de eliminación mediante la administración de un CBD unido a un antagonista del receptor PTH/PTHrP a un sujeto. En una realización, la composición antagonista de PTH se aplica de forma local, por vía tópica. El antagonista de PTH se puede aplicar después de un procedimiento de eliminación del vello para evitar o ralentizar el crecimiento del vello. Tal como se describe en los Ejemplos, los inventores han demostrado que el recrecimiento del pelo se ralentiza después de aplicar depilación con cera a animales tratados con antagonistas de CBD-PTH en comparación con los animales de control tratados con PTH-CBD o vehículo solo. Las composiciones pueden administrarse de forma local o tópica para bloquear el crecimiento del vello.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por medios conocidos por el experto en la materia, que incluyen, aunque no de forma limitativa, vías oral, tópica, intranasal, intraperitoneal, parenteral, intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea. De esta manera, las composiciones pueden formularse como una formulación ingerible, inyectable, tópica o de supositorio. La composición se puede formular para su administración por inyección para dar como resultado una administración sistémica o una administración local. Las composiciones pueden administrarse también mediante un liposoma o vehículo de liberación temporalizada. Las composiciones pueden administrarse también mediante un vehículo de administración dirigida al sitio, tales como, aunque no de forma limitativa, un liposoma dirigido o un transportador de esponja de colágeno absorbible u otro implante.

Los inventores han descubierto que cuando se administran composiciones que incluyen un CBD por vía subcutánea, este se une localmente al sitio de la inyección si la composición está disuelta en un tampón de pH neutro. Pero si la composición está disuelta en un tampón de pH bajo, por ejemplo, un tampón que tiene pH 5,0 o pH 4,5 o inferior, el dominio de unión a colágeno no se une al colágeno, y la composición tiene tiempo para dispersarse sistémicamente antes de unirse al colágeno en otra parte del cuerpo a pH neutro. Por tanto, la administración sistémica de las composiciones implica administrar la composición disuelta en un tampón o solución acuosa a un pH menor de aproximadamente 5,0 o a pH 4,5 o inferior. En otra realización, la administración sistémica de las composiciones implica administrar las proteínas de fusión disueltas en una solución acuosa con un pH inferior a aproximadamente 6,0. Como alternativa, si la dolencia cutánea está localizada, las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar en un tampón con un pH de 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 o superior para permitir la administración localizada de las composiciones en la zona afectada de la piel.

Las composiciones farmacéuticas para administración tópica también se pueden formular usando métodos y composiciones tales como las disponibles para los expertos en la técnica. Por ejemplo, geles, cremas o preparaciones

de liposomas pueden ser adecuados para la administración tópica. Estos vehículos de administración se pueden formular para mediar la administración en las capas inferiores de la piel o para permitir una liberación prolongada en el sitio de aplicación.

5 Las composiciones se pueden administrar como una sola dosis o en forma de dosis divididas. Por ejemplo, la composición se puede administrar dos o más veces separadas por 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, un día, dos días, tres días, cuatro días, una semana, una semana o hasta tres o más semanas. Opcionalmente, dicho tratamiento se puede repetir, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días o cada 1, 2, 3, 4, y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses. Se espera que la composición sea más eficaz que una composición comparable o de control  
10 que comprende el agente Terapéutico o un agonista del receptor PTH/PTHrP que no esté enlazado a una proteína de unión a colágeno. En una realización, se puede usar una cantidad más pequeña de la composición o la composición puede administrarse menos frecuentemente que una composición comparable que comprende el agente terapéutico o un agonista del receptor PTH/PTHrP que no esté enlazado a una proteína de unión a colágeno.

15 Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración proporcionadas en el presente documento están abarcadas por los términos terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. Las dosis individuales de los agentes farmacéuticos que comprenden un segmento polipeptídico de unión a colágeno enlazado a un agente terapéutico pueden ser aproximadamente las mismas en base molar que las dosis usadas para el agente terapéutico en solitario. Se espera que los agentes farmacéuticos que comprenden un segmento polipeptídico de unión a colágeno enlazado  
20 a un agente terapéutico se puedan administrar con menos frecuencia, porque la unión del agente al segmento polipeptídico de unión a colágeno le proporciona una actividad *in vivo* mucho más prolongada.

La administración de las composiciones al sujeto de acuerdo con la invención parece presentar efectos beneficiosos de una manera dependiente de la dosis. Por lo tanto, en amplios límites, se espera que la administración de mayores  
25 cantidades de las composiciones consiga mejores efectos biológicos beneficiosos que la administración de una cantidad más pequeña. Además, también se contempla la eficacia a dosificaciones por debajo del nivel al cual se observa toxicidad.

Se apreciará que la dosificación específica administrada en cualquier caso dado se ajustará de acuerdo con las  
30 composiciones que se están administrando, la enfermedad que se va a tratar o inhibir, el estado del sujeto, y otros factores médicos relevantes que puedan modificar la actividad del agente o la respuesta del sujeto, como saben bien los expertos en la materia. Por ejemplo, la dosis específica para un sujeto concreto depende de la edad, peso corporal, el estado de salud general, la dieta, el calendario y el modo de administración, la tasa de excreción, los medicamentos usados en combinación, y la gravedad del trastorno particular para el que se aplica la terapia. Las dosificaciones para  
35 un paciente dado pueden determinarse usando consideraciones convencionales, por ejemplo, por comparación personalizada de las diferentes actividades de las composiciones de la invención y del agente terapéutico administrado en solitario, tal como mediante un protocolo farmacológico o profiláctico convencional adecuado.

La dosificación máxima para un sujeto es la dosificación más elevada que no produce efectos secundarios indeseables o intolerables. El número de variables con respecto a un régimen profiláctico o de tratamiento. individual es amplio, y se espera un considerable intervalo de dosis. La ruta de administración afectará los requerimientos de dosificación. Se anticipa que las dosis de las composiciones reducirán los síntomas de la patología en tratamiento en al menos un  
40 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con los síntomas antes del tratamiento o los síntomas si no se aplica tratamiento. Se contempla específicamente que las preparaciones y composiciones farmacéuticas pueden paliar o aliviar los síntomas de la enfermedad sin proporcionar una cura o, en algunas realizaciones, se pueden utilizar para curar la enfermedad o trastorno.

Las cantidades de dosificación eficaces adecuadas para administrar las composiciones pueden determinarse por los expertos en la materia, pero normalmente varían desde aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 10.000  
50 microgramos por kilogramo de peso corporal semanalmente, aunque son normalmente de aproximadamente 1.000 microgramos o menos por kilogramo de peso corporal semanalmente. En algunas realizaciones, la cantidad de dosis eficaz está comprendida en un intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 10.000 microgramos por kilogramo de peso corporal semanalmente. En otra realización, la cantidad de dosis eficaz está comprendida en un intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 5.000 microgramos por kilogramo de peso corporal  
55 semanalmente. En otra realización, la cantidad de dosis eficaz está comprendida en un intervalo de aproximadamente 75 a aproximadamente 1000 microgramos por kilogramo de peso corporal semanalmente. Las cantidades de dosis eficaz descritas en el presente documento se refieren a las cantidades totales administradas, es decir, si se administra más de un compuesto, las cantidades de dosis eficaz corresponden a la cantidad total administrada.

La eficacia de las composiciones descritas en el presente documento se puede potenciar en al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 100 % con respecto a un control. tratado con el agente terapéutico en solitario. Se apreciará que la eficacia del tratamiento en cualquier caso  
60 dado se potenciará de forma variable según la composición específica que se use, el tipo de enfermedad a tratar, el estado del sujeto, las formulaciones específicas de los compuestos, y otros factores médicos relevantes que pueden

modificar la actividad de las composiciones o la respuesta del sujeto, según apreciará el experto en la materia.

Se pretende que los siguientes ejemplos sean meramente ilustrativos y en ningún caso deben tomarse como limitantes del alcance de la invención o de las reivindicaciones adjuntas.

5

## Ejemplos

### Ejemplo 1: CBD se dirige a regiones parcialmente desenrolladas o poco enrolladas del colágeno

10 La colagenasa de *Clostridium histolyticum* produce una amplia degradación del colágeno del tejido conectivo dando como resultado gangrena gaseosa. El dominio de unión a colágeno (CBD) del extremo C de estas enzimas es el segmento mínimo necesario para unirse a las fibrillas de colágeno. CBD se une unidireccionalmente al extremo C parcialmente desenrollado de la tripe hélice del colágeno. También se estudió si el CBD también podría dirigirse a las regiones poco enrolladas incluso en la parte central de la triple hélice del colágeno. Los péptidos colagenosos parcialmente desenrollados se sintetizaron introduciendo sustituciones Gly→Ala en el colágeno  $[(\text{POG})_x\text{POA}(\text{POG})_y]_3$  donde  $x+y=9$  y  $x>3$ . Los estudios de titulación realizados con resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  heteronuclear de coherencia de cuanto único (RMN HSQC) con CBD marcado con  $^{15}\text{N}$  demostraron que el minicolágeno desenrollado se une a una brecha de 10 Å de anchura y 25 Å de longitud. Seis péptidos colagenosos desenrollados, marcados cada uno de ellos con un radical nitróxido, se titularon con CBD marcado con  $^{15}\text{N}$ . Los efectos de relajación del espín nuclear paramagnético mostraron que el CBD se une cerca bien del sitio de sustitución Gly→Ala o bien al extremo C de cada minicolágeno. Las mediciones de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) revelaron que CBD prefiere unirse al sitio Gly→Ala que al extremo C. Los espectros de RMN HSQC de minicolágeno marcado con  $^{15}\text{N}$  y de minicolágeno desenrollado no se vieron afectados por la titulación del CBD no marcado. Los resultados implican que el CBD se une a la región parcialmente desenrollada del CBD del minicolágeno, pero no desenrolla activamente la triple hélice.

25

#### Materiales y métodos:

**Producción de proteínas marcadas con  $^{15}\text{N}$ :** El péptido s3b (Gly893-Lys1008) derivado de la colagenasa de clase I de *Clostridium histolyticum* (ColG) se expresó como una glutatión S-transferasa (GST)-proteína de fusión. La GST marcada se escindió mediante trombina, y el CBD se purificó tal como se ha descrito anteriormente. Matsushita, et al., (2001) *J Biol Chem* 276, 8761-8770. El marcado uniforme con el isótopo  $^{15}\text{N}$  se consiguió usando medio mínimo de Tanaka que contiene  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  40 mM. Se estimó que la eficacia de marcado era de un 99,6 %, según espectrometría de masas mediante desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de iones por tiempo de vuelo (MALDI-TOF-EM).

30

**Péptidos:**  $(\text{POG})_{10}$  (SEQ ID NO: 35) se adquirió al Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japón). Otros péptidos se construyeron mediante una estrategia normalizada basada en N-(9-fluorenil) metoxicarbonil (Fmoc) en resinas Rink-amida (Novabiochem, Darmstadt, Alemania). El marcado de espín del extremo N se llevó a cabo sobre la resina por tratamiento con 5 equivalentes de 3-carboxi-PROXYL (Aldrich), 1-hidroxibenzotriazol, diisopropilcarbodiimida en N,N-dimetilformamida a temperatura ambiente durante 2 horas. Las etapas de escisión del péptido y desprotección se llevaron a cabo por tratamiento con un cóctel secuestrante de ácido trifluoroacético (TFA) convencional (TFA: *m*-cresol: tioanisol: agua: triisopropilsilano = 82,5: 5: 5: 5: 2,5, v/v). El marcado de espín en los restos Cys se llevó a cabo con 3-(2-yodoacetamido)-PROXYL (IPSL, Sigma-Aldrich). Brevemente, un exceso de 10 molar de IPSL disuelto en etanol se añadió al mismo volumen de 10 mg/ml de péptido en Tris-HCl 0,1 M (pH 8.8), ácido etilendiaminotetraacético 5 mM. Tras hacer reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h, la reacción se inactivó añadiendo un exceso de ditiotreitól. Todos los péptidos se purificaron mediante HPLC en fase invertida en una columna Cosmosil 5C<sub>18</sub> AR-II (Nacalai Tesque, Kyoto, Japón) y se caracterizó mediante MALDI-TOF-EM. Todas las masas medidas concordaron con los valores esperados. Las estructuras químicas de los péptidos sintetizados se muestran en la Fig. 2.

45

**Espectroscopia de dicroísmo circular:** La conformación de la triple hélice y la estabilidad de los péptidos colagenosos se comprobaron mediante espectroscopia DC (véase la Fig. 3 y la Fig. 4). Los espectros DC se registraron con un espectropolarímetro J-820 CD (JASCO Co., Hachioji, Japón) provisto de un termostador Peltier, usando una cubeta de cuarzo de 0,5 mm y conectado a una estación de datos para promediado de la señal. Todas las muestras de péptidos se disolvieron en agua (1 mg/ml), y se almacenaron a 4 °C durante 24 h. Los espectros se notifican en términos de unidades de elipticidad por mol de restos peptídicos  $[\theta]_{\text{m.w.}}$ . La termoestabilidad de la triple hélice se vigiló mediante los valores de  $[\theta]_{225}$  de cada péptido al aumentar la temperatura a una velocidad de 0,3 °C/min.

50

**Espectroscopia de RMN:** Los experimentos de RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker 700 MHz provisto de cryoprobe™. Todos los experimentos de titulación por RMN se realizaron a  $16 \pm 0,5$  °C. La temperatura de trabajo es menor que las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) de todos los péptidos colagenosos marcados con espín paramagnético utilizados (Tabla 1). La concentración de la proteína fue 0,1 mM en Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 100 mM y CaCl<sub>2</sub> 20 mM. El efecto de dilución durante la titulación se minimizó por titulación de una solución madre muy concentra (4 mM) de péptido. Las alícuotas de péptido colagenoso se añadieron a la proteína y se equilibraron durante 5 min antes de adquirir los espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. El pH de las muestras de RMN analizadas durante la titulación no presentaron un desplazamiento del pH significativo (en  $\pm 0,2$  unidades).

60

**Tabla 1:** Temperaturas de fusión ( $T_m$ ) de varios péptidos de minicolágeno que se usaron en la titulación por RMN y en los experimentos descritos en el presente documento.

65

Péptidos	Tm (° C)	SEQ ID NO:
(POG) <sub>4</sub> POA(POG) <sub>5</sub>	29	38
PROXYL-(POG) <sub>4</sub> POA(POG) <sub>5</sub>	29	38
PROXYL-(POG) <sub>3</sub> POA(POG) <sub>6</sub>	28	39
PROXYL-(POG) <sub>5</sub> POA(POG) <sub>4</sub>	28	37
PROXYL-(POG) <sub>6</sub> POA(POG) <sub>3</sub>	27	36
(POG) <sub>4</sub> POA(POG) <sub>5</sub> C-PROXYL	30	41
<sup>11</sup> PROXYL-(POG) <sub>3</sub> PCG(POG) <sub>4</sub>	28	40

**Experimentos de dispersión de luz dinámica:** Los datos de dispersión de luz dinámica (DLS) se recogieron en un DynaPro-E provisto de un micromuestreador con control de la temperatura sobre las muestras de CBD, péptidos colagenosos y complejos CBD:minicolágeno en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) que contenía cloruro de sodio 100 mM y CaCl<sub>2</sub> 20 mM. Las muestras de proteínas se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min y se filtraron por una jeringuilla Whatman de 0,02 µm directamente a una cubeta de cuarzo de 50 µl. Para cada experimento, se realizaron 20 mediciones. El radio hidrodinámico medio (RH), desviación estándar, polidispersidad, y porcentaje de área de picos se analizaron usando Dynamics V6 (Protein Solutions). Las estimaciones de radio hidrodinámico y peso molecular se calcularon a partir de fluctuaciones dependientes del tiempo inducidas por movimiento browniano, como se ha descrito. Proteau, et al. (2010) *Curr Protoc Protein Sci* Capítulo 17, Unidad 17 10.

**Experimentos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño en solución:** Los datos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño en solución (SAXS) se recogieron en soluciones de CBD, péptidos colagenosos y complejos CBD-minicolágeno en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM y CaCl<sub>2</sub> 20 mM en configuración SAXS/WAXS situada en la línea del haz 5-ID-D del centro de investigación de sincrotrón DND-CAT, Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory (Argonne, IL). La ventaja principal de la dispersión de rayos X es que se puede llevar a cabo en solución en condiciones casi fisiológicas. Petoukhov et al., (2007) *Curr Opin Struct Biol* 17, 562-571. La radiación de 1,2398 Å (10 keV) se seleccionó desde el dispositivo de inserción APS Undulator A usando un monocromador Si-111, con enfoque horizontal 1:1 y mayor rechazo de armónicos procedentes de un espejo revestido Rh y ranuras de definición de haz configuradas de 0,3 en vertical por 0,25 mm en horizontal. Se usó una celda de flujo capilar de 1,6 mm de diámetro con un caudal de 4 µl/s para recoger cuatro marcos con un tiempo de exposición de 10 s. El detector SAXS usado fue un detector de centelleo Mar165 CCD acoplado a fibra óptica y que funcionaba en el intervalo de transferencia de momento de 0,005 < q < 0,198 Å<sup>-1</sup>, donde  $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$  (2θ es el ángulo de dispersión). El detector WAXS era un detector de centelleo Roper CCD acoplado a fibra óptica personalizada y que funcionaba en el intervalo de transferencia de momento de 0,191 < q < 1,8 Å<sup>-1</sup>. S. Weigand, et al. (2009) *Advances in X-ray Analysis* 52, 58-68.

Todos los datos de dispersión se adquirieron a una temperatura de la muestra de 10 °C. Los cuatro patrones de dispersión de cada detector se promediaron y se combinaron con el rechazo de las exploraciones fuera de rango. Para análisis adicional, se usó el programa IGOR Pro 5.5 A (WaveMetrics). Los perfiles de dispersión de la proteína, péptido y sus complejos se obtuvieron después de restar los perfiles del tampón. Los datos de dispersión reducidos se representaron gráficamente como intensidad de dispersión I(Q) vs. Q (Fig. 4A). El radio de girado, R<sub>g</sub>, se obtuvo con la aproximación Guinier por ajuste de mínimos cuadrados en la región QR<sub>g</sub> < 1, donde la intensidad de dispersión hacia adelante I(0) es proporcional al peso molecular del complejo de proteína. Una transformación de Fourier indirecta de los datos I(Q) mediante GNOM proporcionó la función de distribución de partículas P(r) en el espacio real (Fig. 4B). Svergun, D. (1992) *J Appl Crystallogr* 25, 495-503. Donde P(r) interseca con el eje x, representa el diámetro máximo D<sub>máx</sub> promediado en todas las orientaciones. Las envolturas químicas se construyeron para todas las muestras en función de los datos de SAXS después de un cálculo *ab initio* con el programa GASBOR. Svergun, et al. (2001) *Biophys J* 80, 2946-2953. Una minimización de la hibridación simulada de átomos señuelo distribuidos aleatoriamente convergió en la estructura de la proteína después de ensayar el mejor ajuste para los datos de dispersión I(Q). No se aplicaron restricciones de simetría a ninguna de las reconstrucciones de forma. Para cada uno de los complejos, se calcularon diez modelos *ab initio* con GASBOR y se promediaron con DAMAVER. Svergun, D. (2003) *J Appl Crystallogr* 36. Los modelos atómicos representados como una configuración compacta interconectada de esferas de diámetro D<sub>máx</sub> se ajustaron a los datos experimentales I<sub>exp</sub>(s) para minimizar el error. Los modelos atómicos se acoplaron a envolturas *ab initio* con el programa SUBCOMB. Kozin, M. B., y Svergun, D. (2000) *J Appl Crystallogr* 33, 775-777.

**Modelo de acoplamiento:** El complejo CBD-péptido colagenoso se generó a partir de entradas del banco de datos de proteínas de ColG s3b (1NQD) y péptido colagenoso parcialmente desenrollado 1CAG (mutación Ala en la posición 15<sup>a</sup>). Se generaron otras moléculas de minicolágeno desenrolladas por modificación de 1CAG usando fragmentos derivados de la estructura [(POG)<sub>10</sub>]<sub>3</sub> (1K6F). Para obtener el complejo, se usó el algoritmo de acoplamiento BiGGER. Palma, et al. (2000) *Proteins* 39, 372- 384. Las soluciones se filtraron usando datos de titulación por RMN y se seleccionó el modelo de mayor puntuación que se ajustó a los resultados de RMN y SAXS. Los ajustes manuales se complementaron con el uso de MIFit. McRee. (1999) *J Struct Biol* 125, 156-165.

## Resultados y discusión:

**Titulación mediante RMN HSQC de CBD dirigido los sitios poco enrollados del colágeno:** Se sintetizó el péptido colagenoso desenrollado [(POG)<sub>6</sub>POA(POG)<sub>3</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 36) que tiene Ala en la posición 21<sup>a</sup> a contar desde el extremo N. Este péptido se modificó adicionalmente para acomodar una etiqueta de espín paramagnético en el

extremo N. Las titulaciones de RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N se realizaron con [PROXYL-(POG)<sub>6</sub>POA(POG)<sub>3</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 36) y CBD marcado con <sup>15</sup>N en relaciones de 0,02:1 a 1,5:1. Como se ha demostrado anteriormente, un total de once restos de la interfase de unión a colágeno (S928, W956, G971, K995, Y996, L924, T957, Q972, D974, L991 y V993) bien desaparecieron del espectro HSQC o presentaron una perturbación de su desplazamiento químico significativa desde la posición original durante la titulación. Philominathan, et al. (2009) *J Biol Chem* 284, 10868-10876. El grupo PROXYL en el extremo N de los péptidos colagenosos puede causar un engrosamiento de la línea dependiente de la distancia en las señales RMN de CBD durante la titulación. Además de los once restos, tres restos más, V973, G975 y S979 mostraron un engrosamiento de la línea apreciable, y estos restos desaparecieron en su caso del espectro HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N de CBD (Fig. 5A y 5B). Cuando el complejo [PROXYL-(POG)<sub>6</sub>POA(POG)<sub>3</sub>]<sub>3</sub>(SEQ ID NO: 36):CBD se redujo con ácido ascórbico, estos tres restos reaparecieron en el espectro HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N. La desaparición de estos tres restos fue coherente con la titulación de [PROXYL-G(POG)<sub>7</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 42) (el extremo C está en la posición 22 desde el extremo N del PROXYL) según una publicación anterior de los inventores. La comparación de los dos resultados de la titulación demuestra que el CDB se dirige al sitio sustituido Gly→Ala. Si CBD solo se hubiera unido al extremo C del [PROXYL-(POG)<sub>6</sub>POA(POG)<sub>3</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 36) (el extremo C está en la posición 30 desde el extremo N del PROXYL), los inventores esperarían observar la desaparición solo del resto (V973), como máximo, como en la titulación publicada del [PROXYL-G(POG)<sub>7</sub>(PRG)]<sub>3</sub>(SEQ ID NO: 43). La desaparición de los restos (V973, G975 y S979) situados en un lados distal del sitio de unión a Ca<sup>2+</sup> (Fig. 5C) confirmó que el CDB se une unidireccionalmente al colágeno desenrollado análogamente. La superficie de unión al colágeno en el CBD es una hendidura de 10 Å de anchura y 25 Å de longitud. La anchura de la hendidura de unión del CBD se corresponde con el diámetro de la triple hélice y su longitud podría dar cabida al [(POG)<sub>3</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44). Los resultados de la RMN implican que el CBD se une a la región poco enrollada [(POG)<sub>2</sub>POA]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 45) del colágeno.

Puesto que la mejora en la relajación paramagnética es un fenómeno dependiente de la distancia, la sustitución Gly→Ala realizada muy cerca del grupo PROXYL del extremo N debería dar como resultado la desaparición de más restos en el CBD. Los péptidos colagenosos que contienen PROXYL, [PROXYL-(POG)<sub>5</sub>POA(POG)<sub>4</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 37) (Ala en la posición 18ª desde el extremo N del PROXYL), [PROXYL-(POG)<sub>4</sub>POA(POG)<sub>5</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 38) (Ala en la posición 15ª desde el extremo N del PROXYL), y [PROXYL-(POG)<sub>3</sub>POA(POG)<sub>6</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 39) (Ala en la posición 12ª desde el extremo N del PROXYL) se sintetizaron. Análogamente a las titulaciones posteriores, los efectos de engrosamiento de línea de los restos del CBD se analizaron a partir de los cambios en el espectro HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N. Cuanto menor sea la distancia entre el sitio de sustitución Gly→Ala y el PROXYL del extremo N, más restos del CBD desaparecen (Fig. 6 y Tabla 2). La magnitud de la caída de intensidad para cuatro resonancias de la amida (Q972, G975, S979 y L924) de cuatro moléculas de minicolágeno diferentes) también era función de la distancia (Fig. 7). Los resultados de la RMN son coherentes con la unión del CBD a la región [(POG)<sub>2</sub>POA]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 45) de cada uno de los cuatro minicolágenos poco enrollados. Las constantes de unión obtenidas para todas las titulaciones mediante RMN fueron <100 μM lo que indica una afinidad de unión moderada entre el CBD y el minicolágeno poco enrollado.

**Tabla 2:** Restos que desaparecen debido a la presencia de PROXYL bien en el extremo N, en el extremo C o en el centro de la secuencia de péptido colagenoso.

N.º	Péptidos	Posición de alanina	Restos desaparecidos debido al PROXYL
1	<b>Blanco</b> [(POG) <sub>10</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 35)		
2	<b>PROXYL en el extremo N</b> [PROXYL-(POG) <sub>6</sub> POA(POG) <sub>3</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 36)	21	V973, G975, S979
3	[PROXYL-(POG) <sub>5</sub> POA(POG) <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 37)	18	Q972, V973, G975, S979
4	[PROXYL-(POG) <sub>4</sub> POA(POG) <sub>5</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 38)	15	L946, Q972, V973, G975, S979 L946, G953, Q972, V973, D974,
5	[PROXYL-(POG) <sub>3</sub> POA(POG) <sub>6</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 39)	12	G975, N976, V978, S979  S906, R929, S997, G998
6	<b>PROXYL en el extremo C</b> [(POG) <sub>4</sub> POA(POG) <sub>5</sub> -PROXYL] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 41)	15	V973, G975, S979 y S906,  R929, S997, G998
7	<b>PROXYL en el centro</b> [11PROXYL-(POG) <sub>3</sub> PCG(POG) <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 40)		

40 La conformación helicoidal tanto de [(POG)<sub>2</sub>POA]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 45) y el extremo C [(POG)<sub>3</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44) está poco enrollada de forma análoga. El grado de rotación alrededor del eje de simetría del husillo que describe el

enrollamiento en forma de triple hélice interna se define por un valor de enrollamiento helicoidal  $\kappa$ . El valor de  $\kappa$  oscila alrededor de un valor medio de  $-103^\circ$  para [(POG)<sub>10</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 35). Bella (2010) *J Struct Biol* 170, 377-391. El extremo C de un minicolágeno está poco enrollado (desplazamiento del valor  $\kappa$  de  $-103^\circ$  a  $-110^\circ$ ) pero habitualmente el extremo N está demasiado enrollado. Los péptidos del colágeno con sustitución Gly→Ala en el centro de la secuencia peptídica siguen formando triples hélices, pero con un brusco enrollamiento bajo (desplazamiento del valor  $\kappa$  de  $-103^\circ$  a  $-115^\circ$ ) en el sitio de sustitución seguido por un enrollamiento superior a la norma. Como la región [(POG)<sub>2</sub>POA]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 45) está algo menos enrollada que el extremo C [(POG)<sub>3</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44), la primera podría ser una diana más preferente para CBD que la otra. Sin embargo, CBD se podría seguir uniendo al extremo C.

10 **CBD también se dirige al extremo C del minicolágeno poco enrollado:** Para demostrar que el extremo CBD se une al extremo C (POG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44) también, se sintetizó un péptido colagenoso [(POG)<sub>4</sub>POA(POG)<sub>5</sub>-PROXYL]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 38). [(POG)<sub>4</sub>POA(POG)<sub>5</sub>C-PROXYL]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 41) se tituló con CBD marcado con <sup>15</sup>N en relaciones de 0,02:1 a 1,5:1 en incrementos de 0,02, y se realizó seguimiento de los cambios en el espectro HSQC del CBD. Cuando el minicolágeno está unido a la hendidura, un total de once restos de la interfase de unión a colágeno mostraron bien un engrosamiento de la línea o bien una perturbación en el desplazamiento químico, como se ha descrito anteriormente. Philominathan, et al. (2009) *J Biol Chem* 284, 10868-10876. Cuatro restos adicionales S906, R929, S997 y G998 desaparecieron del espectro HSQC debido al PROXYL (Figs. 6 A, B y D). Estos picos reaparecidos tras adición de ácido ascórbico. Este fenómeno es idéntico al de la titulación anterior de los inventores del [GPRG(POG)<sub>7</sub>C-PROXYL]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 46) cuando el extremo CBD es el extremo C. Si el CBD se fuera a unir solamente al sitio de Ala parcialmente enrollado, los inventores habrían observado la desaparición de menos restos. Así, además del direccionamiento a la región (POG)<sub>2</sub>POA (SEQ ID NO: 45) del péptido colagenoso, CBD también se une al extremo C (POG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44). Como se describe, la conformación helicoidal tanto de la región (POG)<sub>2</sub>POA (SEQ ID NO: 45) como del extremo (POG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44) están análogamente poco enrollados en comparación con la norma. Bella. (2010) *J Struct Biol* 170, 377-391. La explicación actual de los autores sobre el motivo de que CBD se dirija a las regiones poco enrolladas es que las posiciones parcialmente desenrolladas de los grupos carbonilo de la cadena principal favorecen las interacciones de enlaces de hidrógeno con el grupo hidroxilo de Tyr994. La mutación Tyr994 en Phe dio como resultado la reducción de 12 veces en la unión al minicolágeno, y la mutación en ala pierde capacidad de unión Ala. Wilson, et al. (2003) *EMBO J* 22, 1743-1752.

30 Para demostrar la capacidad del CBD para unirse tanto a la región (POG)<sub>2</sub>POA (SEQ ID NO: 45) como a la región del extremo C (POG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44), se sintetizó un péptido colagenoso [11PROXYL-(POG)<sub>3</sub>PCG(POG)<sub>4</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 40) modificado para insertar un grupo PROXYL en el centro (posición 11). El grupo PROXYL está unido covalentemente a un resto cisteína. Debido a la presencia del grupo PROXYL voluminoso, se espera que este péptido esté parcialmente desenrollado. El grado preciso de bajo enrollamiento no es conocido para el péptido, pero un minicolágeno con repeticiones GPX muestra un bajo enrollamiento ( $\kappa = -105^\circ$ ). Bella. (2010) *J Struct Biol* 170, 377-391. El voluminoso grupo PROXYL inducirá probablemente un desenrollado mayor de  $\kappa = -105^\circ$ . Además de las resonancias de los once aminoácidos bien con línea engrosada o desplazada, las titulaciones de RMN HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N revelaron dos fenómenos diferentes. A la relación menor (0,2:1) las resonancias de la amida correspondientes a S906, R929, S997, y G998 desaparecieron del espectro HSQC del CBD (Figs. 8E, F y H). Después, a relación mayor (0,3:1), resonancias de la amida adicionales correspondientes a V973, G975 y S979 desaparecieron del espectro HSQC del CBD (Figs. 8E, F y H). Para ocasionar la desaparición de cuatro restos (S906, R929, S997 y G998), CBD se debe unir inicialmente al extremo N (POG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44). La desaparición de las resonancias V973, G975 y S979 se puede explicar si el CBD se une al extremo C (POG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44) del minicolágeno. Sin embargo, el fenómeno inicial significa que el CBD se une preferentemente a la sección central poco enrollada del extremo C.

45 Para demostrar que el PROXYL produce engrosamiento de la línea, y que los restos Ala o Cys no lo hacen, tres péptidos de control más, [(POG)<sub>4</sub>POA(POG)<sub>5</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 38), [(POG)<sub>4</sub>POA(POG)<sub>5</sub>C-carbamidometil]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 41), y [(POG)<sub>3</sub>PCG(POG)<sub>4</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 40) que carecen de los grupos PROXYL se sintetizaron, y se repitieron las titulaciones mediante RMN (Figs. 6F, 8C y 8G, respectivamente). Los resultados de la titulación fueron casi idénticos a los de [(POG)<sub>10</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 35). Solamente las once resonancias de la amida experimentaron bien engrosamiento de la línea o desplazamiento incluso a una relación 1:1 (minicolágeno:CBD). Estos péptidos de control se unieron a la misma hendidura, y PROXYL hizo que los demás restos mostraran engrosamiento de la línea.

55 Para ilustrar si el CBD se une solamente al sitio parcialmente enrollado en el centro del péptido de colágeno, y/o el extremo C del minicolágeno, se realizaron experimentos de dispersión de luz dinámica (DLS). Los experimentos DLS proporcionaron las estequiometrías de los complejos colágeno:CBD. El radio hidrodinámico de [(POG)<sub>4</sub>POA(POG)<sub>5</sub>-PROXYL]<sub>3</sub>(SEQ ID NO: 38):CBD y [11PROXYL-(POG)<sub>3</sub>PCG(POG)<sub>4</sub>]<sub>3</sub>(SEQ ID NO: 40):CBD fue de 3 nm y el peso molecular aparente del complejo fue de 42±1 kDa, que es similar a lo observado para el complejo [(POG)<sub>10</sub>]<sub>3</sub>(SEQ ID NO: 35):CBD (Tabla 3). Otros complejos también presentaron valores similares. Hasta ahora, todos los minicolágenos y el CBD siempre formaron complejos 1:1. CBD se une a uno cualquiera de los sitios disponibles del minicolágeno pero no ocupa ambos sitios para formar un complejo 1:2.

**Tabla 3:** Radio hidrodinámico (RH), peso molecular aparente (Mw), radio de giro (Rg) y diámetro máximo de partícula (D<sub>máx</sub>) calculados según dispersión de luz dinámica (DLS) y dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) para diferentes complejos CBD:péptidos colagenosos.

No	Complejos	Dispersión de luz dinámica (DLS)		Dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS)	
		Radio hidrodinámico (R <sub>H</sub> )	Peso molecular aparente (M <sub>w</sub> )	Radio de giro (R <sub>g</sub> )	Diámetro máx. (D <sub>máx</sub> )
1	CBD:[(POG) <sub>10</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 35)	3	43	22,62 ± 0,04	93
2	CBD:[PROXYL-(POG) <sub>6</sub> POA(POG) <sub>3</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 36)	3	44	24,67 ± 0,09	87
3	CBD:[PROXYL-(POG) <sub>5</sub> POA(POG) <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 37)	3	42	21,08 ± 0,02	90
4	CBD:[PROXYL-(POG) <sub>4</sub> POA(POG) <sub>5</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 38)	3	43	25,48 ± 0,08	92
	CBD:[(POG) <sub>4</sub> POA(POG) <sub>5</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 38)	3	43	24,45 ± 0,14	85
5	CBD:[PROXYL-(POG) <sub>3</sub> POA(POG) <sub>6</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 39)	3	42	21,97 ± 0,14	94
6	CBD:[(POG) <sub>4</sub> POA(POG) <sub>5</sub> C-PROXYL] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 41)	3	44	24,09 ± 0,16	85
	CBD: [(POG) <sub>4</sub> POA(POG) <sub>5</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 38)	3	42	24,67 ± 0,1	84
7	CBD:[11PROXYL-(POG) <sub>3</sub> PCG(POG) <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 40)	3	42		96
	CBD:[(POG) <sub>3</sub> PCG(POG) <sub>4</sub> ] <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 40)	3	43	23,59 ± 0,05	90

- Experimentos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS):** Las formas tridimensionales de los complejos CBD-péptido colagenoso se construyeron con mediciones SAXS. La ventaja principal de las mediciones SAXS es que los experimentos se llevan a cabo en solución en condiciones casi fisiológicas. En el trabajo anterior de los inventores, estas envolturas tridimensionales se utilizaron para demostrar la unión asimétrica del CBD al extremo C (POG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44) del minicolágeno. Las formas moleculares se construyeron para los complejos de CBD y seis moléculas de minicolágeno no enrolladas diferentes. En todos los casos, el CBD se une a la región (POG)<sub>2</sub>POA (SEQ ID NO: 45) preferentemente al extremo C (POG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44) (Figs. 9A-F). Por ejemplo, el modelo de acoplamiento para el CBD:[(POG)<sub>4</sub>POA(POG)<sub>5</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 38) construido usando la estructura cristalina del CBD (n.º de registro pdb 1NQD) interactúa con la región (POG)<sub>2</sub>POA (SEQ ID NO: 45) del colágeno no enrollado (n.º de registro pdb 1CAG) se ajusta bien a la envoltura (Fig 9B). Aunque los resultados de RMN demostraron que el CBD también se une al extremo C (POG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44) de [(POG)<sub>4</sub>POA(POG)<sub>5</sub>-PROXYL]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 38), CBD se une predominantemente a la región (POG)<sub>2</sub>POA (SEQ ID NO: 45) del péptido (Figs. 9E y 9F).
- 15 Las estructuras derivadas de los perfiles SAXS usando cálculos de hibridación simulada para [11PROXYL-(POG)<sub>3</sub>PCG(POG)<sub>4</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 40) (Figs. 9G y 9H) indicaron una densidad adicional que podría atribuirse al grupo PROXYL. La forma tridimensional derivada de SAXS del complejo [11PROXYL-(POG)<sub>3</sub>PCG(POG)<sub>4</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 40):CBD se superpone bien con cualquiera de los complejos derivados por RMN es decir, la unión del CBD al extremo N (POG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44) o al extremo C (POG)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 44) (Figs. 9G y 9H).
- 20 **Poco cambio estructural del <sup>15</sup>N-minicolágeno tras la unión al CBD:** Los estudios hasta el momento sugieren que el CBD analiza las fibrillas de colágeno para detectar las regiones poco enrolladas. Tras la unión a las regiones menos estructuradas, ¿desenrolla el colágeno de forma activa? Activar el desenrollado mediante el CBD facilitaría la colagenolisis. Para la investigación, se sintetizaron dos péptidos colagenosos marcados selectivamente con <sup>15</sup>N cerca del extremo N o C de [(POG)<sub>10</sub>]<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 35) (Tabla 4, péptidos A,B), y se realizó seguimiento de los cambios estructurales debido a la unión del CBD no marcado mediante titulación con HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N.
- 25

Tabla 4: Minicolágeno marcado con <sup>15</sup> N		SEQ ID NO:
A	POGPOG*POGPOGPOGPOGPOGPOGPOGPOGPOG	35
B	POGPOGPOGPOGPOGPOGPOGPOGPOGPOG*POG	35
C	POGPOG*POGPOGPOGPOGPOGPOGPOGPOGPOG	38



y s3b están tabulados (Tabla 5). Los iones de calcio podrían catalizar la isomerización de todas las moléculas de CBD y sus estados de transición y su mecanismo catalítico pueden parecer muy similares.

**Tabla 5:** Enlaces de hidrógeno importantes en la isomerización *trans-cis* del péptido en s3b y sus análogos en s3.

Enlaces H importantes en s3b para la formación del estado de transición	Enlaces H correspondientes en s3
T910_OG1...N903_NH2	S879_OG1...N872_ND2
T910_OG1...N900_N	S879_OG1...K86_N
E899_OE1...N903_ND2	E868_OE1...N872_ND2
E899_OE2...S922_N	E868_OE2...T891_N
N902_OD1...D904_N	NA (N902 sustituido por P871)
D930_OD2...Y1002_OH	D939_OD2...Y97_OH
Y1002_OH...Y932_OH	NA (Y932 sustituido por F901)

5 Los restos no funcionales que son importantes para el plegado o para la estabilidad arquitectónica están conservados. Los restos hidrófobos empaquetados entre las  $\beta$ -láminas se conservan mejor si están situados cerca de restos funcionalmente críticos. Por ejemplo, el Trp956 invariante de la hebra E está empaquetado entre  $\beta$ -láminas. Los restos flanqueantes (Thr955 y Thr957) interactúan con el minicolágeno. Tyr932 está empaquetado entre las láminas y ayuda a colocar Tyr1002. Los restos de curvas cerradas también se han conservado. Gly975 está bien conservado para permitir un giro IF en s3b. Gly942 (equivalente de Gly975) en s3 permite que la cadena secundaria de Asp941 estabilice el giro inverso. Un tramo de seis restos bien conservado, entre los restos 986 y 991, adopta una curva cerrada y antecede la hebra H funcionalmente importante. La región está bien ordenada en las estructuras cristalinas con pocos factores B, y es la menos dinámica según los estudios de RMN y proteólisis limitada con MALDI-TOF MS 10 a colocar Tyr1002. Los restos de curvas cerradas también se han conservado. Gly975 está bien conservado para permitir un giro IF en s3b. Gly942 (equivalente de Gly975) en s3 permite que la cadena secundaria de Asp941 estabilice el giro inverso. Un tramo de seis restos bien conservado, entre los restos 986 y 991, adopta una curva cerrada y antecede la hebra H funcionalmente importante. La región está bien ordenada en las estructuras cristalinas con pocos factores B, y es la menos dinámica según los estudios de RMN y proteólisis limitada con MALDI-TOF MS 15 (25). Philominathan, et al. (2009) J Biol Chem 284:10868-10876 y Sides et al. J Am Soc Mass Spectrom. (2012) 23(3):505-19. Los grupos carbonilo y amino de la cadena principal de Arg985 tienden un enlace de hidrógeno a OH de Tyr989 para estabilizar el giro. Solo Gly987 puede hacer sitio a la voluminosa cadena secundaria de Tyr989. Tyr990 se empaqueta contra el Ala909 invariante y la hélice 310 conservada. Ala909 está en la base del enlazador que experimenta la transformación  $\alpha$ -hélice  $\rightarrow$   $\beta$ -hebra. La curva cerrada puede garantizar que los restos interactuantes del colágeno Leu992, Tyr994, y Tyr996 estén correctamente colocados. Tyr994 es el resto más importante para la interacción con los péptidos colagenosos. Wilson, et al. (2003) EMBO J 22:1743-1752. Las hebras adyacentes a la hebra H, es decir, las hebras C y E, están muy bien conservadas. Las tres hebras antiparalelas moldean el bolsillo de unión a colágeno. Las hebras F apilan las  $\beta$ -láminas por interacción con ambas láminas. El  $\beta$ -hebra interactúa en primer lugar en orientación antiparalela con la hebra E, después rompe su dirección en Gly971 para interactuar con la hebra G. En lugar de Gly971, Ala o Pro se encuentra en la situación donde la hebra cambia su sentido. La doble interacción de la hebra ayuda a colocar Tyr970 para que interactúe con el minicolágeno. 20

Se ha mostrado que tres restos que interactúan fuertemente con el minicolágeno están conservados. El Tyr994 invariante y los restos Tyr970 y Tyr996 bien conservados constituyen el "punto caliente". La mutación Y994A pierde capacidad de unión. Como Y994F da como resultado una reducción de 12 veces en la unión al minicolágeno, el grupo hidroxilo de Tyr994 puede interactuar con el colágeno mediante un enlace de hidrógeno. Tyr996, que es un resto crítico para la unión al minicolágeno, no está tan bien conservado. Y996A produjo una reducción de 40 veces en la unión al minicolágeno. Y996 en s3b está sustituido por Phe en s3, mediante lo cual ambas cadenas tienen idéntica orientación. En otras moléculas de CBD, un resto aromático, tal como Phe o His, se encuentra a veces en el sitio. 30 Y970A da como resultado una reducción de 12 veces en la unión al minicolágeno. Mediante titulación RMN HSQC  $^{15}\text{N}$ , se ha descubierto que Thr957 interactúa con el minicolágeno. Los restos de aminoácidos  $\beta$ -ramificados o Leu se encuentran en las posiciones equivalentes a Thr957 en la mayoría de los CBD. En la titulación con RMN HSQC  $^{15}\text{N}$  se identificó que seis restos más que interactuaban con el minicolágeno no están bien conservados. Puesto que CBS divergentes (s3 y s3b) adoptan un bolsillo de unión en forma de paleta similar, otros CBD podrían adoptar también una estrategia de unión al colágeno similar. 35

Los CBD divergentes podrían dirigirse a diferentes secuencias de colágeno, y posiblemente se podrían dirigir a diferentes tipos de colágeno; sin embargo, este estudio estructural sugiere otra cosa. Más bien, todos los dominios CBD se unen de forma similar a una región poco enrollada tal como el extremo C de una fibrilla de colágeno. El extremo C del colágeno tipo I queda expuesto en la superficie de la fibrilla, según los experimentos de difracción de rayos x en fibras, y este es el sitio más accesible para que la colagenasa bacteriana inicie los asaltos. Sin embargo, no se ha descubierto aún un CBD unido al extremo C del tropocolágeno. Un tándem ColG-CBD (s3a-s3b) marcado con partículas de oro donde las partículas de oro están unidas a fibrillas de colágeno de tipo I no mostró periodicidad. En las fibrillas de colágeno, las moléculas están escalonadas entre sí por aproximadamente 67 nm. Por tanto, un CBD 45 podría dirigirse a las regiones parcialmente poco enrolladas en el centro de un tropocolágeno que también sería vulnerable a asaltos. 50

Muy similar a s3b, s3 es al mismo tiempo compacto y extremadamente estable en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  fisiológico. Por lo tanto, la enzima podría degradar la matriz extracelular durante un tiempo prolongado. El enlazador que induce una transformación estructural es un rasgo común de la colagenasa M9B. Puede actuar como un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  para 55

disparar reordenamientos del dominio como medio de activación enzimática. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz extracelular es superior a la del interior de una bacteria. Tanto s3 como s3b se unen de forma similar a un minicolágeno, así, las moléculas de colagenasa M9B podrían iniciar la colagenolisis a partir de rasgos estructurales análogos en diferentes fibrillas de colágeno. La proteína de fusión de cualquier CBD derivado de la colagenasa M9B y un factor de crecimiento daría como resultado un resultado clínico comparable.

### **Ejemplo 3: Un agonista de CBD-PTH fomenta el crecimiento del cabello y un agonista de CBD-PTH inhibe el crecimiento del cabello**

**10 Caracterización in vitro de compuestos PTH unido a CBD:** La unión a colágeno de cada péptido se comprobó en ensayos de unión a colágeno de flujo pistón como se ha descrito anteriormente en la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2010/0129341. PTH-CBD, que consiste en los 33 primeros aminoácidos de PTH unido directamente al dominio de unión a colágeno (SEQ ID NO: 1) fue el agonista más potente, que tiene un efecto similar al de PTH(1-34) (SEQ ID NO: 7) sobre la acumulación de AMPc. Ponnappakkam et al. (2011) Calcif 88:511-520. Epub 2011 Abr 2022. Entre los antagonistas, PTH(7-33)-CBD (SEQ ID NO: 10) mostró la mejor combinación de baja actividad intrínseca y elevado bloqueo del receptor (no se muestra), similar a lo observado para otros antagonistas de PTH, incluidos los utilizados en los estudios de crecimiento del cabello. Peters, et al. (2001) J Invest Dermatol 117:173-178.

**20 Distribución de PTH-CBD in vivo:** La distribución en los tejidos se evaluó administrando PTH-CBD marcado con  $^{35}\text{S}$  mediante inyección subcutánea, seguido por autorradiografía de preparación completa congelada y del cuerpo completo. PTH-CBD con un sitio de fosforilación entre PTH(1-33) y el CBD se purificó, activó y marcó con [gamma-35] ATP, como se ha descrito anteriormente. Tamai et al. (2003) Infect Immun. 71:5371-5375. Aproximadamente 10,8 mcg de  $^{35}\text{S}$ -PTH-CBD (122 kcm/mcg) se inyectaron por vía subcutánea a ratones de 7 semanas de edad (32-35g). Los ratones se sacrificaron 1 hora o 12 horas después de la inyección, y a continuación se congelaron en hielo seco-acetona. Se prepararon secciones congeladas (50  $\mu\text{m}$ ) con un autocriotomo, se secaron a  $-20^\circ\text{C}$ , y se expusieron a una placa de imagen durante 4 semanas. Parece que la distribución inicial de  $^{35}\text{S}$ -PTH-CBD se realiza en una amplia zona de la piel alrededor del sitio de inyección, seguido por una rápida redistribución en la piel de todo el animal, así como a otros tejidos diferentes (es decir hueso, intestino, vejiga) (Fig. 11). Por tanto, PTH-CBD muestra las propiedades deseadas de distribución y retención en la piel con administración subcutánea.

**PTH-CBD invierte la pérdida de pelo en alopecia inducida por quimioterapia en ratones:** Los inventores compararon la eficacia de agonistas y antagonistas unidos a PTH en alopecia inducida por quimioterapia, utilizando un diseño experimental publicado por Peters, et al., para compuestos PTH no unidos a CBD. Peters, et al. (2001) J Invest Dermatol 117:173-178. Ratones C57BL/6J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) se depilaron para sincronizar los folículos pilosos, y se administró ciclofosfamida (CYP, 150 mg/kg) el día 9 para maximizar el daño inducido por quimioterapia. El agonista (PTH-CBD) y el antagonista (PTH(7-33)-CBD) se administraron 2 días antes de la quimioterapia, y dada la retención a largo plazo de los compuestos sobre la piel, los inventores administraron solo una única dosis para cubrir el calendario de múltiples inyecciones del agonista y el antagonista de PTH en el estudio de Peters, et. al. La dosis administrada de compuestos unidos a CBD (320 mcg/kg) se toleró bien en ratones. Ponnappakkam et al. (2011) Calcif 88:511-520. Epub 2011 Abr 2022.

Los resultados del registro fotodocumental indicaron que el agonista, PTH-CBD, era bastante más eficaz para estimular el crecimiento del pelo de lo que era el antagonista (Fig. 12). El examen histológico reveló cambios morfológicos en los folículos pilosos después de la terapia con CYP, que estaban localizados más superficialmente y mostraban melanocitos agrupados alrededor del bulbo, característicos de la fase distrófica anágena y de la fase catágena (Fig. 13). Aunque el antagonista PTH(7-33)-CBD no tuvo efecto beneficioso, el tratamiento con el agonista PTH-CBD condujo a un enraizamiento más profundo y menor agregación de monocitos, invirtiendo de esta forma los cambios distróficos. Los recuentos de folículos pilosos en fase anágena VI mediante campo muy intenso (HPF) se compararon entre los grupos; los animales tratados con PTH-CBD tuvieron mayor número de folículos pilosos, acercándose a los de los animales que no recibieron quimioterapia (Fig. 14), mientras que el antagonista PTH(7-33)-CBD no tuvo efecto beneficioso.

Es importante destacar que, los inventores no observaron evidencias de efectos adversos derivados de la administración de PTH-CBD. Aunque se sabe que las inyecciones de PTH elevan el calcio sanguíneo y pueden producir cálculos renales, PTH-CBD no tuvo efectos sobre el calcio sérico. Además, no hubo evidencia de una longitud excesiva del pelo en el cuerpo o un exceso de crecimiento de pelo en las orejas y la cola, donde normalmente no está presente una cobertura completa. Los efectos del PTH-CBD sobre el crecimiento del pelo se confirmaron en modelos de alopecia inducida por quimioterapia sin depilación, que son mucho más parecidos a los protocolos clínicos.

**60 Cuantificación de los efectos de PTH-CBD en la alopecia inducida por quimioterapia:** Los inventores continuaron estos estudios comparando los efectos de diferentes dosis de PTH-CBD sobre la alopecia inducida por quimioterapia. En estos estudios, los inventores aplicaron inyecciones más distalmente en la espalda y aplicaron un análisis por escala de grises para cuantificar la cantidad de crecimiento del pelo. La inyección más distal en la espalda permitió a los inventores comparar el crecimiento del pelo después de un tratamiento con PTH-CBD con menos interferencia derivada del crecimiento de pelo normal que, en los ratones, suele suceder desde la cabeza hasta la cola. Los

resultados se muestran en la Fig. 15, lo que indica un efecto dependiente de la dosis sobre el recrecimiento del pelo tanto cualitativamente como cuantitativamente.

**Alopecia inducida por quimioterapia sin depilación:** Aunque el modelo depilado de la alopecia inducida por quimioterapia ofrece un modelo uniforme para la comparación de los efectos del fármaco, se sabe que el proceso de depilación produce daños en el folículo, y puede alterar la respuesta de los animales a la administración de PTH-CBD. Por tanto, los inventores sometieron a ensayo los efectos de PTH-CBD en otro modelo de la alopecia inducida por quimioterapia, donde los animales recibieron 3 ciclos de tratamiento con una terapia con ciclofosfamida (50 mg/kg/semana), similar a la forma habitual en la que se tratarían los pacientes con cáncer. En este modelo, la alopecia tarda mucho más tiempo (4-6 meses) en desarrollarse. Los animales que recibieron una sola dosis de PTH-CBD (320 mcg/kg por vía subcutánea) antes del primer ciclo no desarrollaron pérdida de pelo, como se muestra en la Figura 16.

En un segundo estudio, los inventores compararon los efectos de PTH-CBD cuando se administra con fines profilácticos, en el momento del primer ciclo de quimioterapia, vs. con fines terapéuticos, una vez que aparece la pérdida de pelo. Aunque PTH-CBD fue eficaz en ambos casos, los efectos fueron más evidentes cuando se administró con fines profilácticos. Esto es evidente, tanto de forma visual como cuantitativamente en la Fig. 17, usando el mismo análisis con escala de grises que los inventores utilizaron en el estudio de respuesta a la dosis.

**Alopecia por depilación:** El agonista PTH-CBD parece aumentar el crecimiento del cabello al aumentar el número de folículos pilosos en fase anágena. Por tanto, no hay motivos para creer que los efectos sobre el crecimiento del cabello solo deberían limitarse al modelo de quimioterapia. Por tanto, los inventores sometieron a ensayo tanto PTH-CBD como el compuesto antagonista, PTH(7-33)-CBD, después de retirar el pelo de ratones C57/BL6J por tratamiento con cera (Fig. 18). Los resultados fueron bastante interesantes; los animales tratados con agonista (PTH-CBD) tuvieron una erupción anágena anterior (día 7 vs. día 9 para los controles del vehículo) y mostraron un recrecimiento del pelo más completo hacia el final del estudio (día 18). Los animales tratados con el antagonista (PTH(7-33)-CBD) también tuvieron una erupción anágena temprana, pero el crecimiento del cabello que siguió estuvo notablemente recortada, y el ciclo piloso se detuvo después de ese punto, no observándose crecimiento de pelo adicional. Por lo tanto, parece que la terapia con el agonista actúa estimulando un recrecimiento más rápido del pelo estimulando una transición más rápida a la fase anágena, mientras que el antagonista inhibió el recrecimiento del pelo bloqueando esta transición.

PTH-CBD es una proteína de fusión de los primeros 33 aminoácidos de la hormona paratiroidea (PTH), y un dominio de unión a colágeno de origen bacteriano. La actividad de unión a colágeno hace que PTH-CBD quede retenido en su sitio de acción en el colágeno dérmico, maximizando la eficacia y dando como resultado efectos secundarios sistémicos. PTH-CBD estimula el crecimiento del cabello haciendo que los folículos pilosos entren en una fase anágena VI o fase de crecimiento, supuestamente, activando la señalización WNT y aumentando la producción de beta-catenina. Por tanto, los inventores planificaron los siguientes estudios adicionales para confirmar este mecanismo de acción y determinar el efecto del PTH-CBD sobre dos modelos de ratón genéticamente diferentes con inhibición de la señalización WNT. Estos datos se usarán para formular ensayos clínicos de PTH-CBD como terapia para la alopecia.

**Alopecia Areata:** La alopecia areata es una enfermedad de pérdida de cabello en zonas localizadas debido a la destrucción autoinmunitaria de los folículos pilosos. Los inventores sometieron a ensayo la eficacia de PTH-CBD para fomentar el recrecimiento de pelo en un modelo animal de alopecia areata, el ratón C3H/HeJ injertado. En este modelo, la pérdida de pelo se desarrolla de forma variable durante los 2 primeros meses de vida. En la Fig. 19 se muestran los resultados de una sola dosis de PTH-CBD (320 mcg/kg por vía subcutánea) administrada en el sitio del injerto, el centro de la espalda, donde existía la máxima pérdida de pelo. En comparación con los animales de control tratados con vehículo, que continuaron perdiendo pelo en ese sitio, los animales que recibieron la PTH-CBD comenzaron a mostrar recrecimiento del pelo en los siguientes 1-4 días. Es importante destacar que, se encontró que la respuesta se mantenía durante los 2 meses de duración del experimento.

#### **Ejemplo 4: CBD-PTH puede prevenir o tratar el hiperparatiroidismo**

En este experimento, se extirparon quirúrgicamente los ovarios a las ratas a una edad de 3 meses. A la edad de 9 meses, las ratas recibieron una inyección bien de una sola dosis de PTH-CBD (320 mcg/kg) o bien control con vehículo. Los animales se sacrificaron 6 meses después de la terapia (edad 15 meses). Los niveles de PTH humana intacta se midieron para evaluar los niveles séricos de PTH-CBD, y se encontró que era indetectable en ambos grupos. Se midió el calcio sérico, y no había diferencias entre los grupos (vehículo: 13,5 +/- 1,1 vs. PTH-CBD: 14,3 +/- 1,1 mg/dl, NS). Los niveles de PTH de rata intacta se midieron para evaluar la producción de PTH endógena, y PTH-CBD suprimió el aumento normal de los niveles de PTH endógena observados en ratas envejecidas ovariectomizadas. Estos hallazgos indican que una sola inyección de PTH-CBD puede proporcionar supresión a largo plazo de la producción de PTH endógena, evitando el aumento normal observado con la edad en el modelo de rata ovariectomizada y, por tanto, puede servir como terapia para el hiperparatiroidismo.

**Listado de secuencias**

- <110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS  
MONTEFIORE MEDICAL CENTER  
KITASATO UNIVERSITY  
GENSURE, Robert C.  
5 PONNAPAKKAM, Tulasi  
KATIKANENI, Ranjitha  
PHILOMINATHAN, Sagaya Theresa Leena  
KOIDE, Takaki  
10 MATSUSHITA, Osamu  
SAKON, Joshua
- <120> ADMINISTRACIÓN DE AGENTES TERAPÉUTICOS MEDIANTE UNA PROTEÍNA DE UNIÓN A COLÁGENO
- 15 <130> 5965-00035
- <150> US 61/596.869  
<151> 09/02/2012
- 20 <150> US 61/570.620  
<151> 14/12/2011
- <160> 47
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1  
<211> 158  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Proteína de fusión sintética que contiene un segmento de la hormona paratiroidea y un dominio de unión a colágeno
- 35 <400> 1

ES 2 695 161 T3

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn  
 1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His  
 20 25 30

Asn Gly Ile Asn Ser Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys Glu Pro  
 35 40 45

Asn Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro  
 50 55 60

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

Asp Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly  
 85 90 95

Tyr Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn Ala Val

100

105

110

Ser Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala  
 115 120 125

Asp Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser  
 130 135 140

Tyr Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Gly Arg  
 145 150 155

<210> 2

<211> 251

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión sintética que contiene un segmento de la hormona paratiroidea y un dominio de unión a colágeno y un dominio de la enfermedad del riñón poliquístico de ColH.

<400> 2

ES 2 695 161 T3

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn  
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His  
20 25 30

Asn Gly Ile Pro Glu Ile Lys Asp Leu Ser Glu Asn Lys Leu Pro Val  
35 40 45

Ile Tyr Met His Val Pro Lys Ser Gly Ala Leu Asn Gln Lys Val Val  
50 55 60

Phe Tyr Gly Lys Gly Thr Tyr Asp Pro Asp Gly Ser Ile Ala Gly Tyr  
65 70 75 80

Gln Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Asp Phe Ser Ser Glu Gln Asn Pro  
85 90 95

Ser His Val Tyr Thr Lys Lys Gly Glu Tyr Thr Val Thr Leu Arg Val  
100 105 110

Met Asp Ser Ser Gly Gln Met Ser Glu Lys Thr Met Lys Ile Lys Ile  
115 120 125

Thr Asp Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys Glu Pro Asn Asn Ser  
130 135 140

Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro Val Ser Gly  
145 150 155 160

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

Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly Tyr Gly Gly  
180 185 190

Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn Ala Val Ser Tyr Ala  
195 200 205

Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala Asp Lys Pro  
210 215 220

Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser Tyr Met Pro  
225 230 235 240

Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Gly Arg  
245 250

ES 2 695 161 T3

<211> 5464  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Vector de expresión sintético

<400> 3

	agcttatcga ctgcacggtg caccaatgct tctggcgtca ggcagccatc ggaagctgtg	60
	gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaaggc gcactcccgt	120
	tctggataat gttttttgcg cgcacatcat aacggttctg gcaaatattc tgaaatgagc	180
	tgttgacaat taatcatcgg ctctgtataat gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca	240
	cacaggaaac agtattcatg tcccctatac taggttattg gaaaattaag ggccttgtgc	300
	aaccactcgc acttcttttg gaatatcttg aagaaaaata tgaagagcat ttgtatgagc	360
	gcgatgaagg tgataaatgg cgaaacaaaa agtttgaatt gggtttgag tttcccaatc	420
	ttccttatta tattgatggt gatgttaaata taacacagtc tatggccatc atacgttata	480
	tagctgacaa gcacaacatg ttgggtggtt gtccaaaaga gcgtgcagag atttcaatgc	540
	ttgaaggagc ggttttggat attagatagc gtgtttcgag aattgcatat agtaaagact	600
	ttgaaactct caaagttgat tttcttagca agctacctga aatgctgaaa atgttcgaag	660
	atcgtttatg tcataaaaca tattttaatg gtgatcatgt aaccatcct gacttcatgt	720
10	tgtatgacgc tcttgatggt gttttataca tggaccaat gtgcctggat gcgttcccaa	780

ES 2 695 161 T3

aattagtttg	ttttaaaaa	cgtattgaag	ctatcccaca	aattgataag	tacttgaaat	840
ccagcaagta	tatagcatgg	cctttgcagg	gctggcaagc	cacgtttggg	ggtggcgacc	900
atcctccaaa	atcggatctg	atcgaaggtc	gttctgtgag	tgaaatacag	cttatgcata	960
acctgggaaa	acatctgaac	tcgatggaga	gagtagaatg	gctgcgtaag	aagctgcagg	1020
atgtgcacaa	tggaattaat	tccccggtat	atccaatagg	cactgaaaaa	gaaccaaata	1080
acagtaaaga	aactgcaagt	ggtccaatag	taccaggtat	acctgttagt	ggaaccatag	1140
aaaatacaag	tgatcaagat	tatttctatt	ttgatgttat	aacaccagga	gaagtaaaaa	1200
tagatataaa	taaattaggg	tacggaggag	ctacttgggt	agtatatgat	gaaaataata	1260
atgcagtatc	ttatgccact	gatgatgggc	aaaatttaag	tggaaagttt	aaggcagata	1320
aaccaggtag	atattacatc	catctttaca	tgtttaatgg	tagttatatg	ccatatagaa	1380
ttaatataga	aggttcagta	ggaagataat	atthtattag	ttgaggtaac	tccactcgaa	1440
ttggtcgact	cgagcggccg	catcgtgact	gactgacgat	ctgcctcgcg	cgtttcggtg	1500
atgacggtga	aaacctctga	cacatgcagc	tcccggagac	ggtcacagct	tgtctgtaag	1560
cggatgccgg	gagcagacaa	gcccgtcagg	gcgcgtcagc	gggtgttggc	gggtgtcggg	1620
gocgagccat	gaccagtca	cgtagcgata	gcggagtgta	taattcttga	agacgaaagg	1680
gcctcgtgat	acgcctatth	ttataggtha	atgcatgat	aataatggth	tcttagacgt	1740
caggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	gaaccctat	ttgthtattt	ttctaaatac	1800
attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	aaccctgata	aatgcttcaa	taatattgaa	1860
aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgccct	tattccctth	tttgcggcat	1920
tttgccttcc	tgthtttgct	caccagaaa	cgctggtgaa	agtaaaagat	gctgaagatc	1980
agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaac	tggatctcaa	cagcggtaag	atccttgaga	2040
gttttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	tgagcactth	taaagttctg	ctatgtggcg	2100
cgttattatc	ccgtgttgac	gcccgggcaag	agcaactcgg	tcgccgcata	cactattctc	2160
agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	tcttacggat	ggcatgacag	2220
taagagaatt	atgcagtgct	gccataacca	tgagtataaa	cactgcggcc	aacttacttc	2280
tgacaacgat	cggaggaccg	aaggagctaa	ccgctthttt	gcacaacatg	ggggatcatg	2340
taactcgcct	tgatcgttgg	gaaccggagc	tgaatgaagc	cataccaaac	gacgagcgtg	2400
acaccacgat	gcctgcagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	actattaact	ggcgaactac	2460
ttactctagc	ttcccggcaa	caattaatag	actggatgga	ggcggataaa	gthtcaggac	2520
cacttctgcg	ctcggccctt	ccggctggct	gthttattgc	tgataaatct	ggagccggtg	2580
agcgtgggtc	tcgcggtatc	attgcagcac	tggggccaga	tggtaagccc	tcccgtatcg	2640
tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	acgaaataga	cagatcgcctg	2700

ES 2 695 161 T3

agataggtgc ctcaactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac 2760  
 tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg 2820  
 ataatctcat gacccaaaatc ccttaacgtg agttttcggt ccaactgagcg tcagacccccg 2880  
 tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc 2940  
 aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc 3000  
 tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt 3060  
 agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc 3120  
 taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact 3180  
 caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac 3240  
 agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 3300  
 aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggttaag ggcagggtcg 3360  
 gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtctg 3420  
 tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga 3480  
 gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt 3540  
 ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct 3600  
 ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg 3660  
 aggaagcggg agagcgcctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac 3720  
 accgcataaa ttccgacacc atcgaatggt gcaaaaacct tcgcggtatg gcatgatagc 3780  
 gcccggaaga gagtcaattc aggggtggtg atgtgaaacc agtaacgtta tacgatgtcg 3840  
 cagagtatgc cgggtgtctt tatcagaccg tttcccgcgt ggtgaaccag gccagccacg 3900  
 tttctgcgaa aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc ggagctgaat tacattocca 3960  
 accgcgtggc acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgct gattggcgtt gccacctcca 4020  
 gtctggccct gcacgcgccg tcgcaaattg tcgcggcgat taaatctcg gccgatcaac 4080  
 tgggtgccag cgtggtggtg tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc tgtaaagcgg 4140  
 cgggtgcacaa tcttctcgcg caacgcgtca gtgggtgat cattaactat ccgctggatg 4200  
 accaggatgc cattgctgtg gaagctgcct gcactaatgt tccggcgta tttcttgatg 4260  
 tctctgacca gacaccatc aacagtatta tttctoccca tgaagacggt acgcgactgg 4320  
 gcgtggagca tctggtcgca ttgggtcacc agcaaatcgc gctgtagcg gcccattaa 4380  
 gttctgtctc ggcggtctg cgtctggctg gctggcataa atatctcact cgcaatcaaa 4440  
 ttcagccgat agcggaacgg gaaggcgact ggagtgccat gtccggtttt caacaaacca 4500  
 tgcaaatgct gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct ggttgccaac gatcagatgg 4560

ES 2 695 161 T3

cgctgggcg aatgcgcgcc attaccgagt ccgggctgcg cgttggtgcg gatatactcgg 4620  
tagtgggata cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccgccgta accaccatca 4680  
aacaggattt tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg cttgctgcaa ctctctcagg 4740  
gccaggcggg gaagggcaat cagctggtgc ccgtctcact ggtgaaaaga aaaaccaccc 4800  
tggcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg 4860  
cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttag 4920  
ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga 4980  
attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cggattcact 5040  
ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc gttaccacaac ttaatcgct 5100  
tgcagcacat ccccctttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgc cccgatcgccc 5160  
ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgcttt gcctggtttc cggcaccaga 5220  
agcggtgccg gaaagctggc tggagtgcga tcttctgag gccgatactg tcgtcgtccc 5280  
ctcaaactgg cagatgcacg gttacgatgc gcccatctac accaacgtaa cctatcccat 5340  
tacggtcaat ccgccgtttg ttcccacgga gaatccgacg ggttggtact cgctcacatt 5400  
taatgttgat gaaagctggc tacaggaagg ccagacgcga attatTTTTG atggcggttg 5460  
aatt 5464

<210> 4  
<211> 383  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Proteína de fusión sintética GST-PTH-CBD

<400> 4

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro  
1 5 10 15  
Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu  
20 25 30  
Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu  
35 40 45  
Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys  
50 55 60  
Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn  
65 70 75 80

ES 2 695 161 T3

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu  
85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser  
100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu  
115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn  
130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp  
145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu  
165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr  
180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala  
195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Ile Glu Gly  
210 215 220

Arg Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu  
225 230 235 240

Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val  
245 250 255

His Asn Gly Ile Asn Ser Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys Glu  
260 265 270

Pro Asn Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile  
275 280 285

Pro Val Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe Tyr  
290 295 300

Phe Asp Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu  
305 310 315 320

Gly Tyr Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn Ala  
325 330 335

ES 2 695 161 T3

Val Ser Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys  
 340 345 350

Ala Asp Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly  
 355 360 365

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

<210> 5  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético: Secuencia de reconocimiento del Factor Xa

<400> 5

Ile Glu Gly Arg  
 1

<210> 6  
 <211> 1021  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium histolyticum

<400> 6

Met Lys Arg Lys Cys Leu Ser Lys Arg Leu Met Leu Ala Ile Thr Met  
 1 5 10 15

Ala Thr Ile Phe Thr Val Asn Ser Thr Leu Pro Ile Tyr Ala Ala Val  
 20 25 30

Asp Lys Asn Asn Ala Thr Ala Ala Val Gln Asn Glu Ser Lys Arg Tyr  
 35 40 45

Thr Val Ser Tyr Leu Lys Thr Leu Asn Tyr Tyr Asp Leu Val Asp Leu  
 50 55 60

Leu Val Lys Thr Glu Ile Glu Asn Leu Pro Asp Leu Phe Gln Tyr Ser  
 65 70 75 80

Ser Asp Ala Lys Glu Phe Tyr Gly Asn Lys Thr Arg Met Ser Phe Ile  
 85 90 95

Met Asp Glu Ile Gly Arg Arg Ala Pro Gln Tyr Thr Glu Ile Asp His  
 100 105 110

Lys Gly Ile Pro Thr Leu Val Glu Val Val Arg Ala Gly Phe Tyr Leu

ES 2 695 161 T3

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

ES 2 695 161 T3

Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Lys Glu Val Asn Ser Gln Phe Phe Arg Val  
 370 375 380

Tyr Gly Ile Asp Lys Pro Leu Glu Glu Gly Asn Pro Asp Asp Ile Leu  
 385 390 395 400

Thr Met Val Ile Tyr Asn Ser Pro Glu Glu Tyr Lys Leu Asn Ser Val  
 405 410 415

Leu Tyr Gly Tyr Asp Thr Asn Asn Gly Gly Met Tyr Ile Glu Pro Glu  
 420 425 430

Gly Thr Phe Phe Thr Tyr Glu Arg Glu Ala Gln Glu Ser Thr Tyr Thr  
 435 440 445

Leu Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Tyr Thr His Tyr Leu Gln Gly Arg  
 450 455 460

Tyr Ala Val Pro Gly Gln Trp Gly Arg Thr Lys Leu Tyr Asp Asn Asp  
 465 470 475 480

Arg Leu Thr Trp Tyr Glu Glu Gly Gly Ala Glu Leu Phe Ala Gly Ser  
 485 490 495

Thr Arg Thr Ser Gly Ile Leu Pro Arg Lys Ser Ile Val Ser Asn Ile  
 500 505 510

His Asn Thr Thr Arg Asn Asn Arg Tyr Lys Leu Ser Asp Thr Val His  
 515 520 525

Ser Lys Tyr Gly Ala Ser Phe Glu Phe Tyr Asn Tyr Ala Cys Met Phe  
 530 535 540

Met Asp Tyr Met Tyr Asn Lys Asp Met Gly Ile Leu Asn Lys Leu Asn  
 545 550 555 560

Asp Leu Ala Lys Asn Asn Asp Val Asp Gly Tyr Asp Asn Tyr Ile Arg  
 565 570 575

Asp Leu Ser Ser Asn Tyr Ala Leu Asn Asp Lys Tyr Gln Asp His Met  
 580 585 590

Gln Glu Arg Ile Asp Asn Tyr Glu Asn Leu Thr Val Pro Phe Val Ala  
 595 600 605

Asp Asp Tyr Leu Val Arg His Ala Tyr Lys Asn Pro Asn Glu Ile Tyr  
 610 615 620

ES 2 695 161 T3

Ser Glu Ile Ser Glu Val Ala Lys Leu Lys Asp Ala Lys Ser Glu Val  
625 630 635 640

Lys Lys Ser Gln Tyr Phe Ser Thr Phe Thr Leu Arg Gly Ser Tyr Thr  
645 650 655

Gly Gly Ala Ser Lys Gly Lys Leu Glu Asp Gln Lys Ala Met Asn Lys  
660 665 670

Phe Ile Asp Asp Ser Leu Lys Lys Leu Asp Thr Tyr Ser Trp Ser Gly  
675 680 685

Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr Asn Tyr Lys Val Asp Ser Ser  
690 695 700

Asn Arg Val Thr Tyr Asp Val Val Phe His Gly Tyr Leu Pro Asn Glu  
705 710 715 720

Gly Asp Ser Lys Asn Ser Leu Pro Tyr Gly Lys Ile Asn Gly Thr Tyr  
725 730 735

Lys Gly Thr Glu Lys Glu Lys Ile Lys Phe Ser Ser Glu Gly Ser Phe  
740 745 750

Asp Pro Asp Gly Lys Ile Val Ser Tyr Glu Trp Asp Phe Gly Asp Gly  
755 760 765

Asn Lys Ser Asn Glu Glu Asn Pro Glu His Ser Tyr Asp Lys Val Gly  
770 775 780

Thr Tyr Thr Val Lys Leu Lys Val Thr Asp Asp Lys Gly Glu Ser Ser  
785 790 795 800

Val Ser Thr Thr Thr Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ser Glu Asn Lys Leu  
805 810 815

Pro Val Ile Tyr Met His Val Pro Lys Ser Gly Ala Leu Asn Gln Lys  
820 825 830

Val Val Phe Tyr Gly Lys Gly Thr Tyr Asp Pro Asp Gly Ser Ile Ala  
835 840 845

Gly Tyr Gln Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Asp Phe Ser Ser Glu Gln  
850 855 860

Asn Pro Ser His Val Tyr Thr Lys Lys Gly Glu Tyr Thr Val Thr Leu  
865 870 875 880

ES 2 695 161 T3

Arg Val Met Asp Ser Ser Gly Gln Met Ser Glu Lys Thr Met Lys Ile  
885 890 895

Lys Ile Thr Asp Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys Glu Pro Asn  
900 905 910

Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro Val  
915 920 925

Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp  
930 935 940

Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly Tyr  
945 950 955 960

Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn Ala Val Ser  
965 970 975

Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala Asp  
980 985 990

Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser Tyr  
995 1000 1005

Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Gly Arg  
1010 1015 1020

<210> 7  
<211> 84  
5 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn  
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His  
20 25 30

Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro Arg Asp Ala Gly Ser  
35 40 45

Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu Ser His Glu  
50 55 60

Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asp Lys Ala Asp Val Asn Val Leu Thr Lys  
65 70 75 80

10

Ala Lys Ser Gln

ES 2 695 161 T3

5 <210> 8  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln  
 1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His  
 20 25 30

Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu Val Ser Pro Asn Ser Lys Pro  
 35 40 45

Ser Pro Asn Thr Lys Asn His Pro Val Arg Phe Gly Ser Asp Asp Glu  
 50 55 60

Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Glu Thr Tyr Lys Glu  
 65 70 75 80

Gln Pro Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Lys Gly Lys Pro Gly Lys  
 85 90 95

Arg Lys Glu Gln Glu Lys Lys Lys Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp Leu  
 100 105 110

Asp Ser Gly Val Thr Gly Ser Gly Leu Glu Gly Asp His Leu Ser Asp  
 115 120 125

Thr Ser Thr Thr Ser Leu Glu Leu Asp Ser Arg Arg His  
 130 135 140

10 <210> 9  
 <211> 160  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Proteínas de fusión sintética Gly-Ser-PTH(1-33)-CBD

20 <400> 9

Gly Ser Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His  
 1 5 10 15

ES 2 695 161 T3

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp  
 20 25 30

Val His Asn Gly Ile Asn Ser Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys  
 35 40 45

Glu Pro Asn Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly  
 50 55 60

Ile Pro Val Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe  
 65 70 75 80

Tyr Phe Asp Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys  
 85 90 95

Leu Gly Tyr Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn  
 100 105 110

Ala Val Ser Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe  
 115 120 125

Lys Ala Asp Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn  
 130 135 140

Gly Ser Tyr Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Gly Arg  
 145 150 155 160

<210> 10  
 <211> 152  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Proteína de fusión sintética PTH(7-33)-CBD

<400> 10

ES 2 695 161 T3

Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu  
1 5 10 15

Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Gly Ile Asn Ser Pro  
20 25 30

Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys Glu Pro Asn Asn Ser Lys Glu Thr  
35 40 45

Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro Val Ser Gly Thr Ile Glu  
50 55 60

Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Val Ile Thr Pro Gly

65 70 75 80

Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly Tyr Gly Gly Ala Thr Trp  
85 90 95

Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn Ala Val Ser Tyr Ala Thr Asp Asp  
100 105 110

Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala Asp Lys Pro Gly Arg Tyr  
115 120 125

Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser Tyr Met Pro Tyr Arg Ile  
130 135 140

Asn Ile Glu Gly Ser Val Gly Arg  
145 150

<210> 11

<211> 35

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> PTH(1-33) sintética con extensión del extremo amino Gly-Ser

<400> 11

Gly Ser Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His  
1 5 10 15

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp  
20 25 30

Val His Asn  
35

15

ES 2 695 161 T3

<210> 12  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Secuencia de escisión de la trombina sintética  
 <400> 12  
 10  
 Leu Val Pro Arg Gly Ser  
 1 5  
 <210> 13  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium histolyticum  
 15  
 <400> 13  
 Leu Lys Glu Lys Glu Asn Asn Asp Ser Ser Asp Lys Ala Thr Val Ile  
 1 5 10 15  
 Pro Asn Phe Asn Thr Thr Met Gln Gly Ser Leu Leu Gly Asp Asp Ser  
 20 25 30  
 Arg Asp Tyr Tyr Ser Phe Glu Val Lys Glu Glu Gly Glu Val Asn Ile  
 35 40 45  
 Glu Leu Asp Lys Lys Asp Glu Phe Gly Val Thr Trp Thr Leu His Pro  
 50 55 60  
 Glu Ser Asn Ile Asn Asp Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Val Asp Gly Asn  
 65 70 75 80  
 Lys Val Ser Asn Lys Val Lys Leu Arg Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Leu  
 85 90 95  
 Val Tyr Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Glu Leu Arg Val Asn  
 100 105 110  
 20  
 <210> 14  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> C. sporogenes  
 25  
 <400> 14

ES 2 695 161 T3

Ile His Glu Lys Glu Asn Asn Asp Ser Phe Glu Ser Ala Asn Lys Ile  
 1 5 10 15

Val Leu Asn Ala Pro Ile Leu Gly Ser Leu Asn Gly Glu Asp Leu Arg  
 20 25 30

Asp Ile Tyr Ser Phe Glu Ile Lys Glu Thr Lys Asp Leu Asn Ile Lys  
 35 40 45

Leu Thr Asn Leu Asn Asn Leu Gly Leu Thr Trp Thr Leu Tyr Lys Glu  
 50 55 60

Ser Asp Leu Asn Asn Tyr Ile Ala Tyr Gly Ser Lys Leu Gly Ser Thr  
 65 70 75 80

Ile Val Gly Asn Cys His Val Thr Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Tyr Val  
 85 90 95

Tyr Lys Tyr Ser Gly Asn Asn Gly Asn Tyr Ser Leu Ile Ile Lys

100

105

110

<210> 15  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> C. botulinum

5

<400> 15

Ile Tyr Glu Lys Glu Asn Asn Asp Ser Phe Glu Thr Ala Asn Lys Ile  
 1 5 10 15

Met Leu Asn Thr Thr Val Leu Gly Asn Leu Asn Gly Lys Asp Val Arg  
 20 25 30

Asp Ile Tyr Ser Phe Asp Ile Lys Glu Ala Lys Asp Leu Asp Ile Lys  
 35 40 45

Leu Asn Asn Leu Asn Asn Leu Gly Leu Ala Trp Asn Leu Tyr Lys Glu  
 50 55 60

Ser Asp Leu Asn Asn Tyr Ile Ala Tyr Gly Ser Val Ser Gly Asn Thr  
 65 70 75 80

Ile Lys Gly Lys Cys Asn Val Ala Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Tyr Val  
 85 90 95

Tyr Lys Tyr Ser Gly Asp Asn Gly Asn Tyr Ser Leu Ala Ile Lys  
 100 105 110

10

ES 2 695 161 T3

5 <210> 16  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> B. cereus

<400> 16

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

Gly Leu Asn Thr Thr Ile Lys Gly Ser Leu Ile Gly Gly Asp His Thr  
 20 25 30

Asp Val Tyr Thr Phe Asn Val Ala Ser Ala Lys Asn Ile Asn Ile Ser  
 35 40 45

Val Leu Asn Glu Tyr Gly Ile Gly Met Thr Trp Val Leu His His Glu  
 50 55 60

Ser Asp Met Gln Asn Tyr Ala Ala Tyr Gly Gln Val Asn Gly Asn His  
 65 70 75 80

Ile Glu Ala Asn Phe Asn Ala Lys Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Tyr Val  
 85 90 95

Tyr Lys Tyr Asp Asn Gly Asp Gly Thr Tyr Glu Leu Ser Val Lys  
 100 105 110

10 <210> 17  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> B. anthracis

15 <400> 17

ES 2 695 161 T3

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

Gly Leu Asn Thr Thr Ile Lys Gly Ser Leu Ile Gly Gly Asp His Thr  
20 25 30

Asp Val Tyr Thr Phe Asn Val Ala Ser Ala Lys Asn Ile Asp Ile Ser  
35 40 45

Val Leu Asn Glu Tyr Gly Ile Gly Met Thr Trp Val Leu His His Glu  
50 55 60

Ser Asp Met Gln Asn Tyr Ala Ala Tyr Gly Gln Ala Asn Gly Asn His  
65 70 75 80

Ile Glu Ala Asn Phe Asn Ala Lys Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Tyr Val  
85 90 95

Tyr Lys Tyr Asp Asn Gly Asp Gly Thr Tyr Glu Leu Ser Val Lys  
100 105 110

<210> 18  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> Bacillus sp.

5

<400> 18

Lys Thr Glu Ile Glu Pro Asn Asn Arg Pro Glu Glu Ala Thr Met Leu  
1 5 10 15

Pro Phe Asn Thr Pro Leu Ser Gly Ser Leu Met Glu Asp Asp His Thr  
20 25 30

Asp Val Tyr Glu Phe Asn Val Thr Ser Pro Lys Glu Ile Asp Ile Ser  
35 40 45

Val Leu Asn Glu Asn Gln Ile Gly Met Thr Trp Val Leu Tyr His Glu  
50 55 60

Ser Asp Ser Gln Asn Tyr Ala Ser Phe Gly Gln Glu Asp Gly Asn Met  
65 70 75 80

Ile Asn Gly Lys Trp Asn Ala Lys Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Tyr Val  
85 90 95

Tyr Lys Phe Glu Asn Glu Asn Gly Thr Tyr Thr Val His Val Gln  
100 105 110

<210> 19  
<211> 111  
<212> PRT

15

ES 2 695 161 T3

<213> L. sphaericus

<400> 19

Lys Ala Glu Ile Glu Pro Asn Asn Arg Pro Glu Glu Ala Thr Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Phe Asn Thr Pro Leu Lys Gly Arg Leu Met Asp Asp Asp His Thr  
 20 25 30  
 Asp Val Tyr Glu Phe Asn Val Thr Ser Pro Lys Glu Leu Asp Ile Ser  
 35 40 45  
 Val Leu Asn Glu Asn Arg Ile Gly Met Thr Trp Val Leu Tyr His Glu  
 50 55 60  
 Ser Asp Ser Gln Asn Tyr Ala Ser Phe Gly Gln Glu Glu Gly Asn Met  
 65 70 75 80  
 Ile Asn Gly Lys Leu His Ala Glu Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Tyr Val  
 85 90 95  
 Tyr Lys Phe Glu Asn Glu Asn Gly Thr Tyr Thr Val Gln Val Gln  
 100 105 110

5

<210> 20

<211> 111

<212> PRT

<213> C. cerus

10

<400> 20

Val Thr Glu Asn Glu Pro Asn Asn Glu Pro Arg Gln Ala Asn Lys Val  
 1 5 10 15  
 Asn Phe His Thr Pro Val Lys Gly Thr Leu His Asn Ser Asp Arg Val  
 20 25 30  
 Asp Val Phe Thr Phe Gln Ile Asp Ser Pro Glu Asn Ile Asn Ile Ser  
 35 40 45  
 Leu Leu Asn Glu Gln Asn Ile Gly Met Thr Trp Val Leu His His Glu  
 50 55 60  
 Ser Asp Leu Asn Asn Tyr Val Ala Tyr Gly Glu Asn Glu Gly Asn Val  
 65 70 75 80  
 Val Lys Gly Thr Tyr Asn Ala Lys Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Tyr Val  
 85 90 95  
 Tyr Lys Tyr Glu Asn Lys Asp Gly Ser Tyr Val Leu Asn Ile Lys  
 100 105 110

15

ES 2 695 161 T3

<210> 21  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> B. mycoides

5

<400> 21

```

Ser Val Glu Lys Glu Pro Asn Asn Ser Phe Gln Thr Ala Asn Lys Leu
1          5          10
Gln Leu Asn Gln Leu Leu Arg Ala Ser Leu Gly Asn Gly Asp Thr Ser
20          25          30
Asp Tyr Phe Glu Ile Asn Val Glu Thr Ala Arg Asn Leu Gln Ile Asn
35          40          45
Val Thr Lys Glu Asn Asn Ile Gly Val Asn Trp Val Leu Tyr Ser Ala
50          55          60
Ala Asp Leu Asn Asn Tyr Val Thr Tyr Ala Gln Thr Gln Gly Asn Lys
65          70          75
Leu Val Gly Ser Tyr Asn Ala His Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu His Val
85          90          95
Tyr Gln Tyr Gly Gly Gly Thr Gly Asn Tyr Thr Val Glu Val Lys
100         105         110
  
```

10 <210> 22  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> B. weihensteph

15 <400> 22

ES 2 695 161 T3

Ala Val Glu Lys Glu Pro Asn Asn Ser Phe Asp Ala Ala Asn Pro Leu  
1 5 10 15

Ser Leu Asn Ala Leu Leu Arg Gly Asn Leu Ser Asp Gln Asp Gln Val  
20 25 30

Asp Arg Phe Val Ile Asp Val Lys Asp Pro Lys Asp Leu Gln Ile Thr  
35 40 45

Val Thr Asn Glu Gln Asn Leu Gly Leu Asn Trp Val Leu Tyr Ser Glu  
50 55 60

Ser Asp Leu Asn Asn Tyr Val Thr Tyr Ala Thr Lys Arg Asp Gly Asn  
65 70 75 80

Lys Leu Leu Gly Asn Tyr Asn Ala Lys Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Ser  
85 90 95

Val Tyr Lys Tyr Gly Gly Gly Thr Gly Asn Phe Thr Val Glu Val Lys  
100 105 110

<210> 23  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> B. brevis

5

<400> 23

Glu Lys Glu Gln Glu Pro Asn Asn Ser Phe Ser Glu Ala Asn Pro Leu  
1 5 10 15

Lys Ser Asn Val Glu Leu Ser Gly Gln Thr Ser Lys Gln Asp Asp Lys  
20 25 30

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

Val Thr Ser Glu His Asp Thr Gly Leu Asn Trp Val Val His His Glu  
50 55 60

Asp Asp Leu Asn Asn Tyr Leu Ala Tyr Pro Lys Thr Ser Gly Lys Thr  
65 70 75 80

Leu Ser Gly Glu Phe Glu Ala Thr Pro Gly Thr Tyr Tyr Leu Ser Val  
85 90 95

Tyr Asn Phe Asn Gly Glu Thr Ile Pro Tyr Lys Val Thr Ala Glu

10

100

105

110

ES 2 695 161 T3

5 <210> 24  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> B. brevis

<400> 24

```

Pro Thr Glu Val Glu Pro Asn Asn Ser Phe Asp Asp Ala Asn Thr Leu
1          5          10          15

Gln Leu Gly Lys Glu Ile Ser Gly Gln Thr Asp Arg Thr Asp Asp Lys
20          25          30

Asp Thr Tyr Met Ile Gln Val Glu Glu Glu Gly Val Ile Gln Val Thr
35          40          45

Val Ser Ser Glu Lys Asp Glu Gly Leu Asn Trp Val Val Phe His Glu
50          55          60

Asp Asp Leu Lys Thr Tyr Phe Ala Tyr Pro Lys Thr Thr Gly Lys Lys
65          70          75          80

Leu Thr Gly Glu Phe Glu Ala Lys Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Leu Val
85          90          95

Tyr Asn Thr Asn Asn Thr Lys Ile Pro Tyr Lys Ala Ile Val Asn
100          105          110
  
```

10 <210> 25  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> C. perfringens  
 15 <400> 25

ES 2 695 161 T3

Ile Lys Glu Val Glu Asn Asn Asn Asp Phe Asp Lys Ala Met Lys Val  
 1 5 10 15

Asp Ser Asn Ser Lys Ile Val Gly Thr Leu Ser Asn Asp Asp Leu Lys  
 20 25 30

Asp Ile Tyr Ser Ile Asp Ile Lys Asn Pro Ser Asp Leu Asn Ile Val  
 35 40 45

Val Glu Asn Leu Asp Asn Ile Lys Met Asn Trp Leu Leu Tyr Ser Ala  
 50 55 60

Asp Asp Leu Ser Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Asn Ala Asp Gly Asn Lys  
 65 70 75 80

Leu Ser Asn Thr Cys Lys Leu Asn Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Cys Val  
 85 90 95

Tyr Gln Phe Glu Asn Ser Gly Thr Gly Asn Tyr Thr Val Asn Leu Gln  
 100 105 110

- <210> 26
- <211> 115
- <212> PRT
- <213> C. sporogenes
- <400> 26

5

ES 2 695 161 T3

Ile Ser Glu Lys Glu Asp Asn Asp Ser Phe Asp Lys Ala Asn Arg Val  
 1 5 10 15

Gly Lys Asn Gln Thr Val Leu Ala Thr Leu Asp Thr Lys Asp Asn Arg  
 20 25 30

Asp Thr Tyr Tyr Phe Asp Ala Leu Ala Ala Arg Thr Ile Asp Ile Val  
 35 40 45

Met Glu Asn Thr Asp Asn Asn Ser Thr Ile Phe Asn Trp Leu Ala Tyr  
 50 55 60

Ser Ser Asp Asn Thr Asn Asn Tyr Ile Gly Tyr Pro Thr Lys Lys Glu  
 65 70 75 80

Gly Asn Lys Leu Met Gly Ser Phe Lys Val Pro Lys Pro Gly Arg Tyr  
 85 90 95

Tyr Ile Leu Ala Tyr Lys Asn Ser Ser Asn Lys Ile Asn Tyr Lys Leu  
 100 105 110

Thr Ile Asn  
 115

<210> 27  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> C. botulinum

5

<400> 27

Ile Ser Glu Lys Glu Asp Asn Asn Ser Phe Asp Lys Ala Asn Arg Val  
 1 5 10 15

Cys Lys Asn Gln Ser Val Ile Ala Thr Leu Asp Thr Asn Asp Pro Arg  
 20 25 30

10

ES 2 695 161 T3

Asp Thr Tyr Tyr Phe Asp Ala Leu Thr Ala Gly Asn Ile Glu Val Thr  
 35 40 45

Met Gly Asn Thr Asp Asn Ser Ser Asn Glu Phe Asn Trp Leu Ala Tyr  
 50 55 60

Ser Ser Asp Asn Thr Asn Asn Tyr Ile Gly Tyr Ala Thr Lys Arg Glu  
 65 70 75 80

Gly Asn Lys Ile Thr Gly Asn Phe Lys Val Asp Lys Pro Gly Arg Tyr  
 85 90 95

Tyr Ile Val Ala Tyr Lys Thr Ser Ser Asn Lys Ile Asn Tyr Lys Leu  
 100 105 110

Asn Ile Lys  
 115

<210> 28  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> C. sporogenes

5

<400> 28

Val Ser Glu Lys Glu Asp Asn Asn Asp Phe Thr Thr Ala Asn Pro Val  
 1 5 10 15

Tyr Tyr Lys Asp Leu Val Asn Gly Ser Val Ser Ser Ser Asp Asn Lys  
 20 25 30

Asp Thr Phe Tyr Phe Thr Val Thr Lys Pro Ser Asp Ile Thr Ile Thr  
 35 40 45

Val Glu Lys Thr Asn Asn Asp Lys Ser Glu Phe Asn Trp Leu Leu Phe  
 50 55 60

Ser Asp Glu Asp Lys Ser Asn Tyr Met Ala Phe Pro Asn Lys Glu Leu  
 65 70 75 80

Gly Asn Gln Leu Ser Asn Thr Val Lys Ile Asn Lys Pro Gly Lys Tyr  
 85 90 95

Tyr Leu Val Ile Tyr Lys Thr Leu Gly Glu Lys Val Asp Tyr Lys Phe  
 100 105 110

Ser Ile Glu  
 115

10

ES 2 695 161 T3

<210> 29  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> C. botulinum

5

<400> 29

```

Val Ser Glu Lys Glu Asn Asn Asn Asp Tyr Val Asn Ala Asn Pro Val
1          5          10          15

Tyr Ser Lys Asp Leu Val Asn Gly Ser Val Ser Ser Ser Asp Asp Arg
          20          25          30

Asp Ile Phe Tyr Phe Asn Val Thr Lys Pro Ser Asp Ile Thr Ile Asn
          35          40          45

Val Glu Lys Ile Asn Lys Asp Lys Ser Glu Phe Ser Trp Leu Leu Phe
          50          55          60

Ser Glu Glu Asp Lys Ser Asn Tyr Ile Thr Tyr Pro Asn Lys Glu Leu
65          70          75          80

Glu Asn Leu Phe Tyr Ser Thr Val Lys Ile Asp Lys Pro Gly Lys Tyr
          85          90          95

Tyr Leu Val Ile Tyr Lys Val Ser Gly Glu Lys Ser Asp Tyr Arg Phe
          100          105          110

Asn Ile Glu
          115
    
```

10

<210> 30  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> C. sordellii

15

<400> 30

```

Gly Val Glu Gln Glu Asp Asn Asn Ser Phe Glu Lys Ala Asn Pro Phe
1          5          10          15

Ser Ile Asn Gln Leu Val Lys Gly Glu Leu Asp Asn Asn Lys Asp Thr
          20          25          30

Ser Asp Tyr Phe Lys Phe Glu Val Lys Glu Asp Ala Gln Leu Asn Ile
          35          40          45

Ser Leu Glu Lys Thr Glu Gly Asp Gly Val Asn Trp Leu Leu Phe Lys
          50          55          60
    
```

ES 2 695 161 T3

Asp Ser Asp Leu Glu Asn Tyr Ile Ala Ser Pro Thr Glu Ser Ile Asp  
65 70 75 80

Asn Lys Leu Asn Gly Lys Val Asp Leu Lys Val Gly Thr Tyr Tyr Leu  
85 90 95

Glu Val Tyr Gly Tyr Gly Ser Ser Pro Val Lys Tyr Asn Phe Lys Val  
100 105 110

Thr

5 <210> 31  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Clostridium histolyticum  
  
<400> 31

Thr Lys Glu Met Glu Pro Asn Asp Asp Ile Lys Glu Ala Asn Gly Pro  
1 5 10 15

Ile Val Glu Gly Val Thr Val Lys Gly Asp Leu Asn Gly Ser Asp Asp  
20 25 30

Ala Asp Thr Phe Tyr Phe Asp Val Lys Glu Asp Gly Asp Val Thr Ile  
35 40 45

Glu Leu Pro Tyr Ser Gly Ser Ser Asn Phe Thr Trp Leu Val Tyr Lys  
50 55 60

Glu Gly Asp Asp Gln Asn His Ile Ala Ser Gly Ile Asp Lys Asn Asn  
65 70 75 80

Ser Lys Val Gly Thr Phe Lys Ser Thr Lys Gly Arg His Tyr Val Phe  
85 90 95

Ile Tyr Lys His Asp Ser Ala Ser Asn Ile Ser Tyr Ser Leu Asn Ile  
100 105 110

10 Lys  
  
<210> 32  
<211> 113  
<212> PRT  
15 <213> C. perfringens  
  
<400> 32



ES 2 695 161 T3

Ser Gln Glu Val Gly Asn Asp Asp Thr Phe Glu Thr Ala Asn Gly Pro  
 1 5 10 15

Ile Lys Ile Asn Thr Asn Tyr Ser Gly Asp Leu Ser Asp Thr Asp Asn  
 20 25 30

Lys Asp Tyr Tyr Tyr Phe Asn Leu Asp Asn Pro Ser Asn Ile Asn Ile  
 35 40 45

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

Glu Ser Asp Leu Asn Asn Tyr Val Ala Tyr Pro Thr Thr Ser Gly Ala  
 65 70 75 80

Ile Leu Asn Gly Asp Tyr Asn Ala Thr Lys Pro Gly Lys Tyr Tyr Ile  
 85 90 95

Leu Val Tyr Asn His Asp Lys Ser Ile Ala Asn Tyr Asn Leu Lys Val  
 100 105 110

Asn

- <210> 34
- <211> 111
- 5 <212> PRT
- <213> Clostridium histolyticum
- <400> 34

ES 2 695 161 T3

Gly Thr Glu Lys Glu Pro Asn Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro  
 1 5 10 15

Ile Val Pro Gly Ile Pro Val Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp  
 20 25 30

Gln Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile  
 35 40 45

Asp Ile Asn Lys Leu Gly Tyr Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp  
 50 55 60

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

Ser Gly Lys Phe Lys Ala Asp Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu  
 85 90 95

Tyr Met Phe Asn Gly Ser Tyr Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu  
 100 105 110

5 <210> 35  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(30)  
 <223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 35

Pro Xaa Gly Pro  
 1 5 10 15

Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly

20 25 30

20 <210> 36  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido sintético

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(30)  
 <223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

ES 2 695 161 T3

<400> 36

Pro Xaa Gly Pro  
1 5 10 15

Xaa Gly Pro Xaa Ala Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly  
20 25 30

5 <210> 37  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Péptido sintético

<220>  
<221> misc\_feature  
15 <222> (1)..(30)  
<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 37

Pro Xaa Gly Pro  
1 5 10 15

Xaa Ala Pro Xaa Gly  
20 25 30

20 <210> 38  
<211> 30  
<212> PRT  
25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(30)  
<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 38

Pro Xaa Gly Pro Xaa Ala Pro  
1 5 10 15

Xaa Gly Pro Xaa Gly  
20 25 30

40 <210> 39  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

<220>  
<221> misc\_feature  
45 <222> (1)..(30)  
<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina  
50

ES 2 695 161 T3

<400> 39

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Ala Pro Xaa Gly Pro  
 1 5 10 15

Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly  
 20 25 30

5

<210> 40  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Péptido sintético

15

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(24)  
 <223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

20

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Cys Gly Pro Xaa Gly Pro  
 1 5 10 15

Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly  
 20

25

<210> 41  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Péptido sintético

35

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(31)  
 <223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 41

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Ala Pro  
 1 5 10 15

Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Cys  
 20 25 30

40

<210> 42  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Péptido sintético

50

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(22)

ES 2 695 161 T3

<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 42

Gly Pro Xaa Gly  
 1 5 10 15

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly  
 20

5

<210> 43

<211> 31

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(31)

<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

20

<400> 43

Gly Pro Xaa Gly  
 1 5 10 15

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Arg Gly Pro Arg Gly Pro Arg Gly  
 20 25 30

25

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(9)

35 <223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 44

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly  
 1 5

40

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Péptido sintético

50

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(9)

<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 45

ES 2 695 161 T3

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Ala  
1 5

5 <210> 46  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Péptido sintético

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(26)  
15 <223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 46

Gly Pro Arg Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly

1 5 10 15

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Cys  
20 25

20 <210> 47  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Péptido sintético: GST Tag

30 <400> 47

Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly  
1 5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende un segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano unido a un agonista del receptor PTH/PTHrP para su uso en un método para tratar la alopecia areata en un sujeto que necesita crecimiento del cabello, que comprende administrar la composición a un sujeto para aumentar el crecimiento del cabello.
- 10 2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición se administra de forma local.
- 10 3. La composición para el uso de la reivindicación 2, en donde la composición se administra de forma tópica.
- 15 4. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la composición se administra en solución acuosa a un pH inferior a 5,0.
- 20 5. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano comprende un polipéptido de unión a colágeno derivado de una peptidasa M9 seleccionada entre el grupo que consiste en *Clostridium*, *Bacillus* y *Vibrio*, uno de las SEQ ID NOs: 13-34 o un fragmento de al menos 8 aminoácidos consecutivos de las SEQ ID NOs:13-34, restos 34-158 de la SEQ ID NO: 1, un fragmento de al menos 8 aminoácidos consecutivos de los restos 34-158 de la SEQ ID NO: 1, y un péptido que es al menos un 90 % idéntico a los restos 34-158 de la SEQ ID NO: 1 o las SEQ ID NOs: 13-34.
- 25 6. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el agonista del receptor PTH/PTHrP comprende los restos 1-33 de la SEQ ID NO: 1, PTH (SEQ ID NO: 7), los restos 1-14 de la SEQ ID NO: 1, restos 1-34 de la SEQ ID NO: 7 o un fragmento de al menos 8 aminoácidos consecutivos de los restos 1-34 de la SEQ ID NO: 7.
- 30 7. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el agonista del receptor de PTH/PTHrP es un polipéptido, y el extremo N del segmento polipeptídico de unión a colágeno está unido directamente o mediante un segmento polipeptídico enlazador al extremo C del polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP.
- 35 8. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el segmento polipeptídico de unión a colágeno y el agente terapéutico están químicamente reticulados entre sí o son porciones polipeptídicas de una proteína de fusión.
- 40 9. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el sujeto es humano.
- 40 10. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano comprende una de las SEQ ID NOs: 13-34, restos 34-158 de la SEQ ID NO: 1, o un péptido que es al menos un 90 % idéntico a los restos 34-158 de la SEQ ID NO: 1 o las SEQ ID NOs: 13-34.
- 45 11. La composición para el uso de la reivindicación 10, en la que el segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano comprende los restos 34-158 de la SEQ ID NO: 1.
- 45 12. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el agonista del receptor PTH/PTHrP comprende los restos 1-33 de la SEQ ID NO: 1, PTH (SEQ ID NO: 7), los restos 1-14 de la SEQ ID NO: 1, restos 1-34 de la SEQ ID NO: 7.
- 50 13. La composición para el uso de la reivindicación 12, en la que el agonista del receptor PTH/PTHrP comprende los restos 1-33 de la SEQ ID NO: 1.
- 50 14. La composición para el uso de la reivindicación 13, en la que el segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano comprende los restos 34-158 de la SEQ ID NO: 1.





Figura 3A

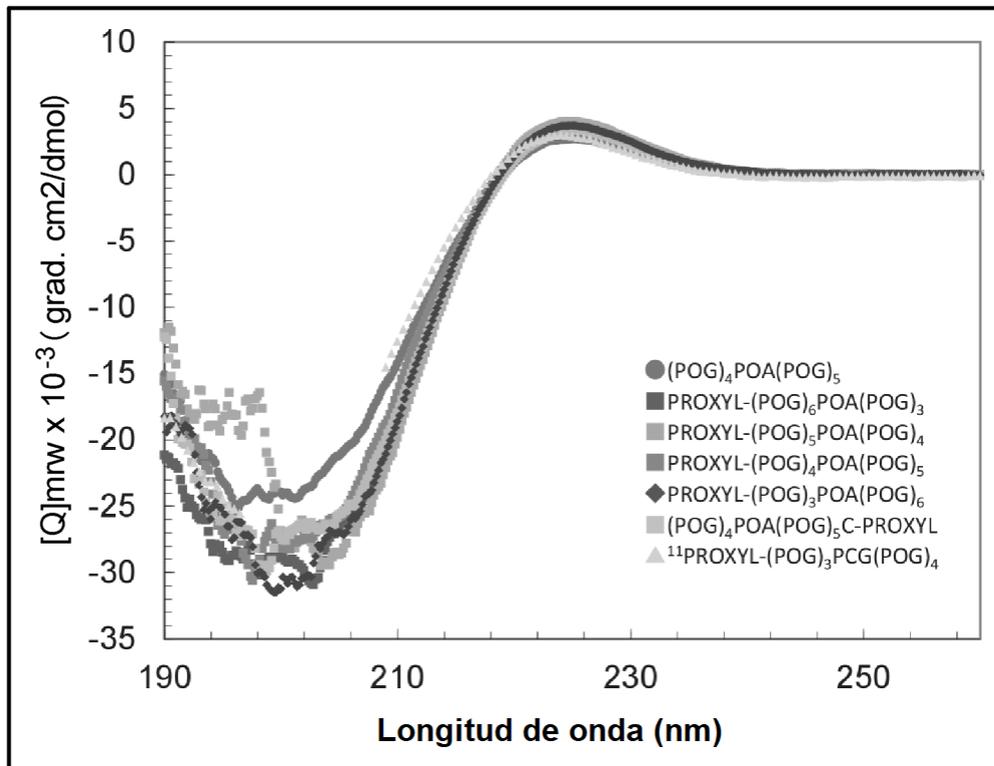


Figura 3B

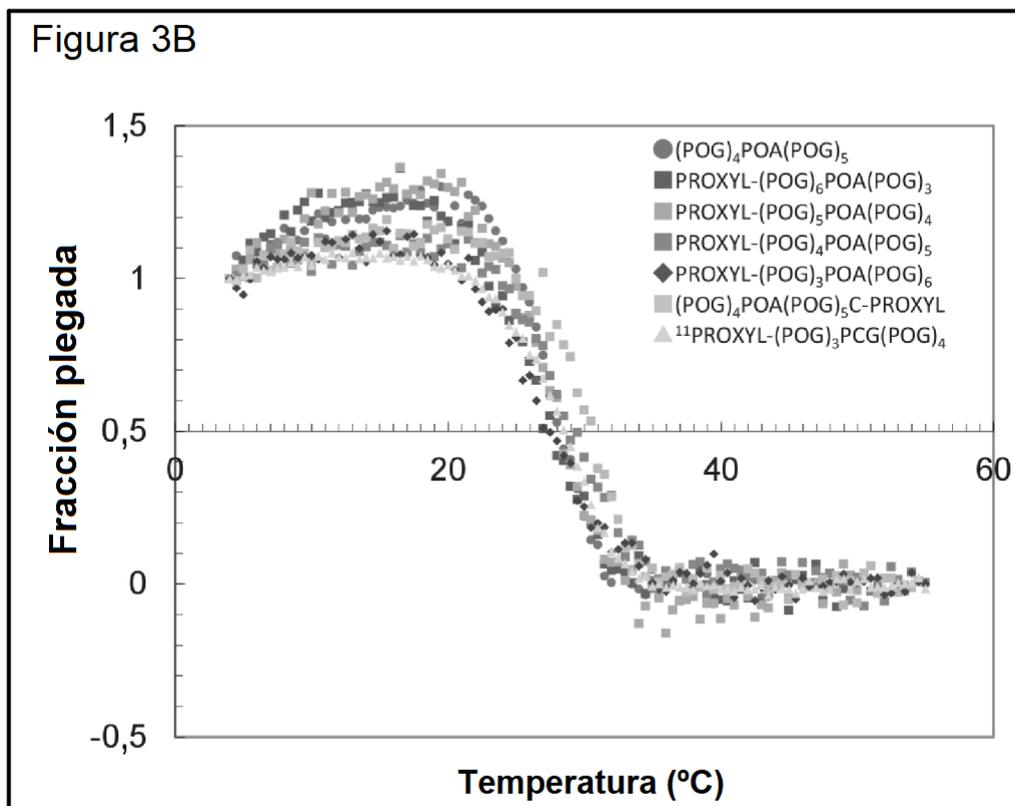


Figura 4

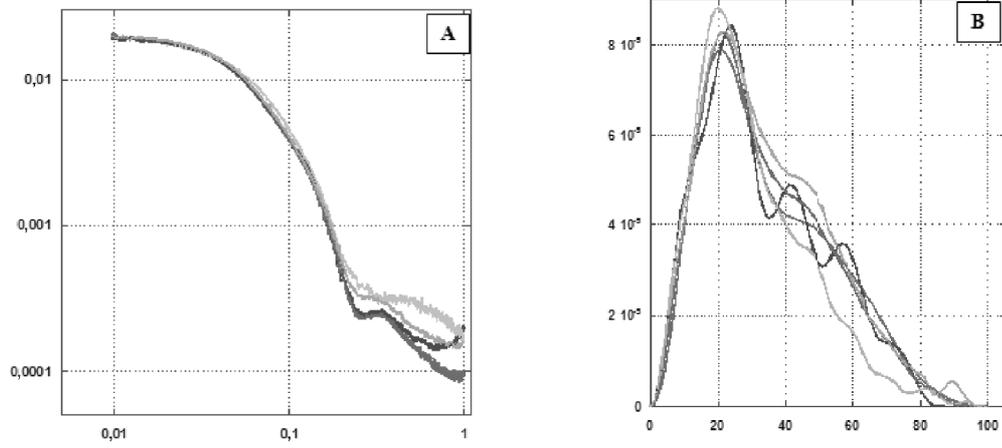


Figura 5

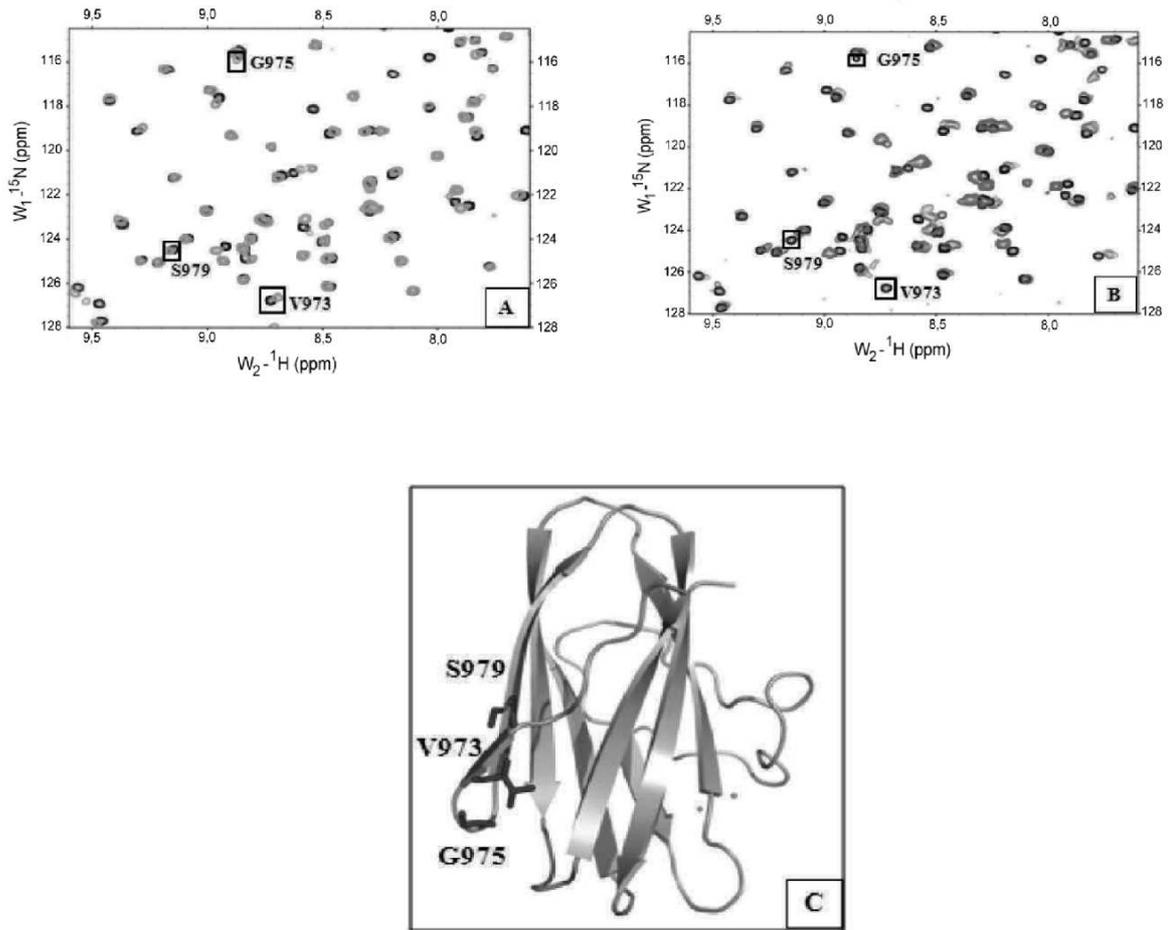


Figura 6

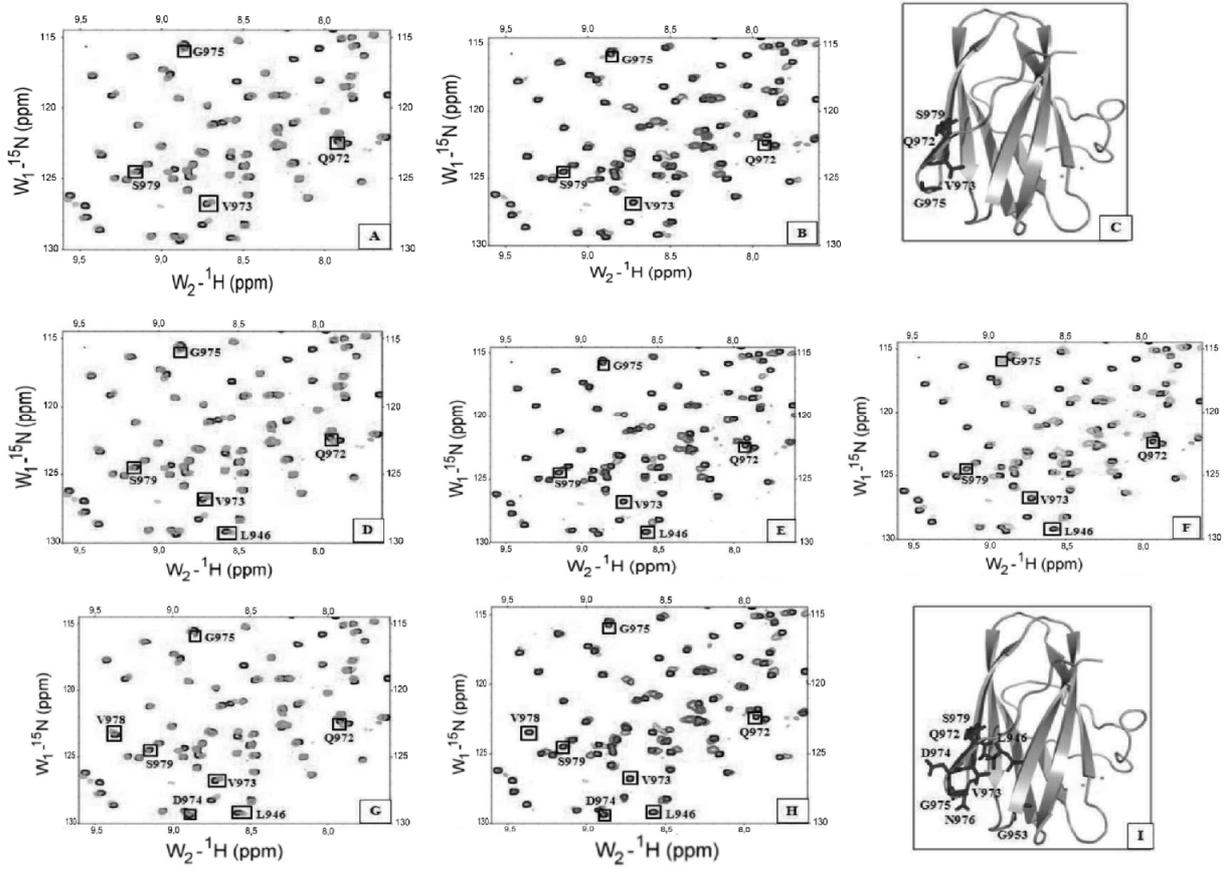


Figura 7

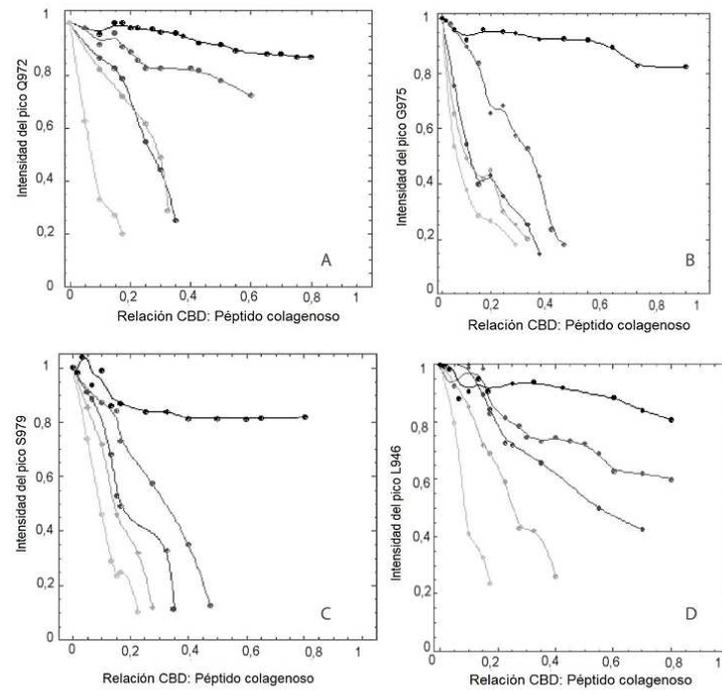


Figura 8

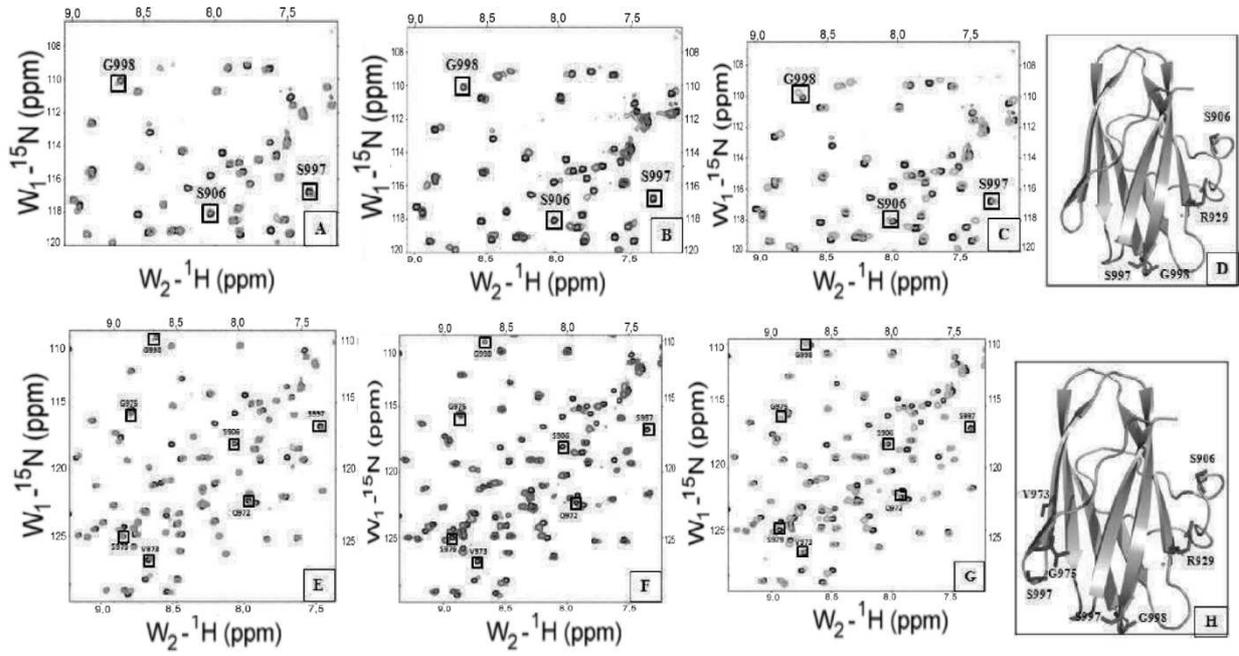


Figura 9

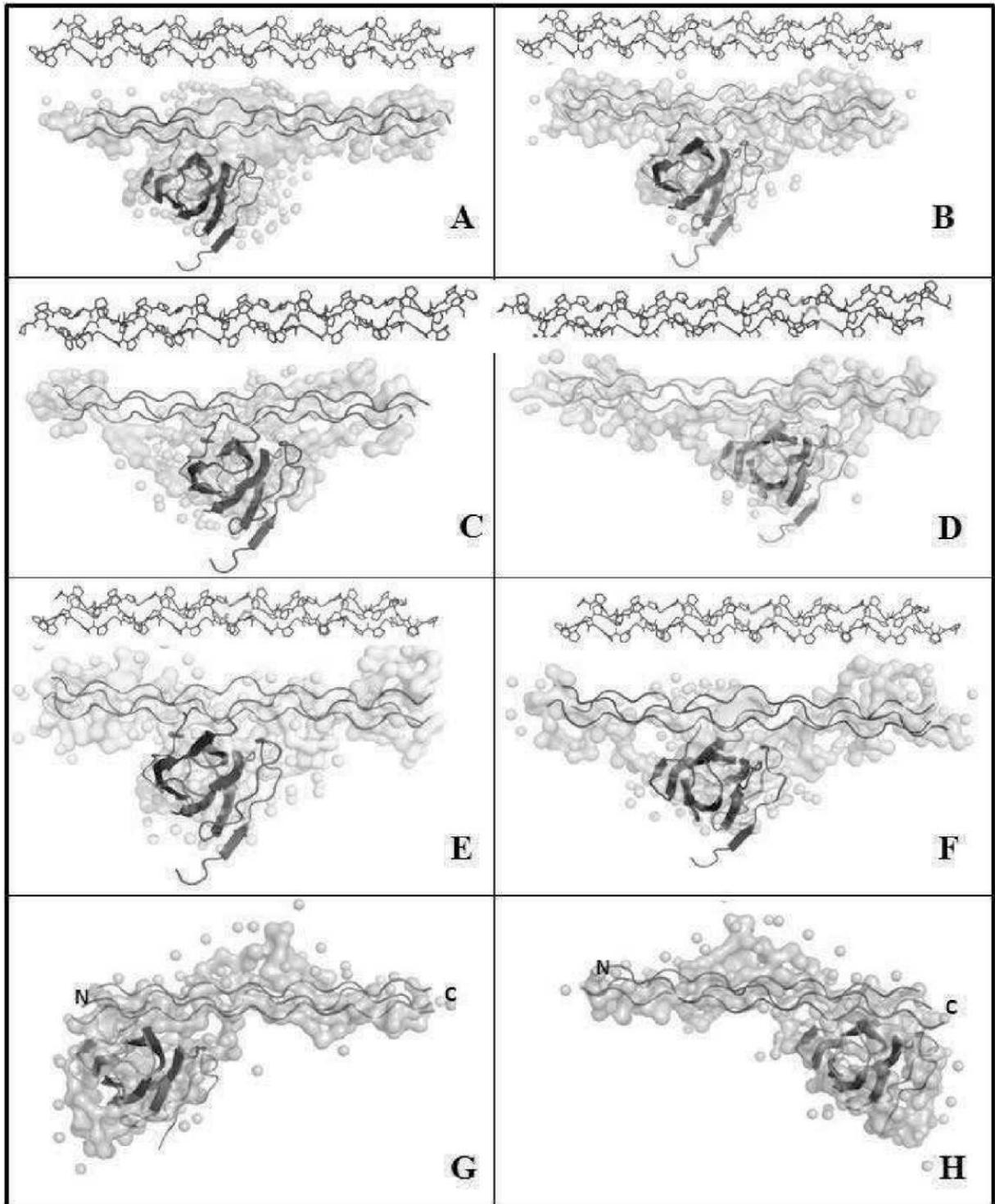


Figura 10

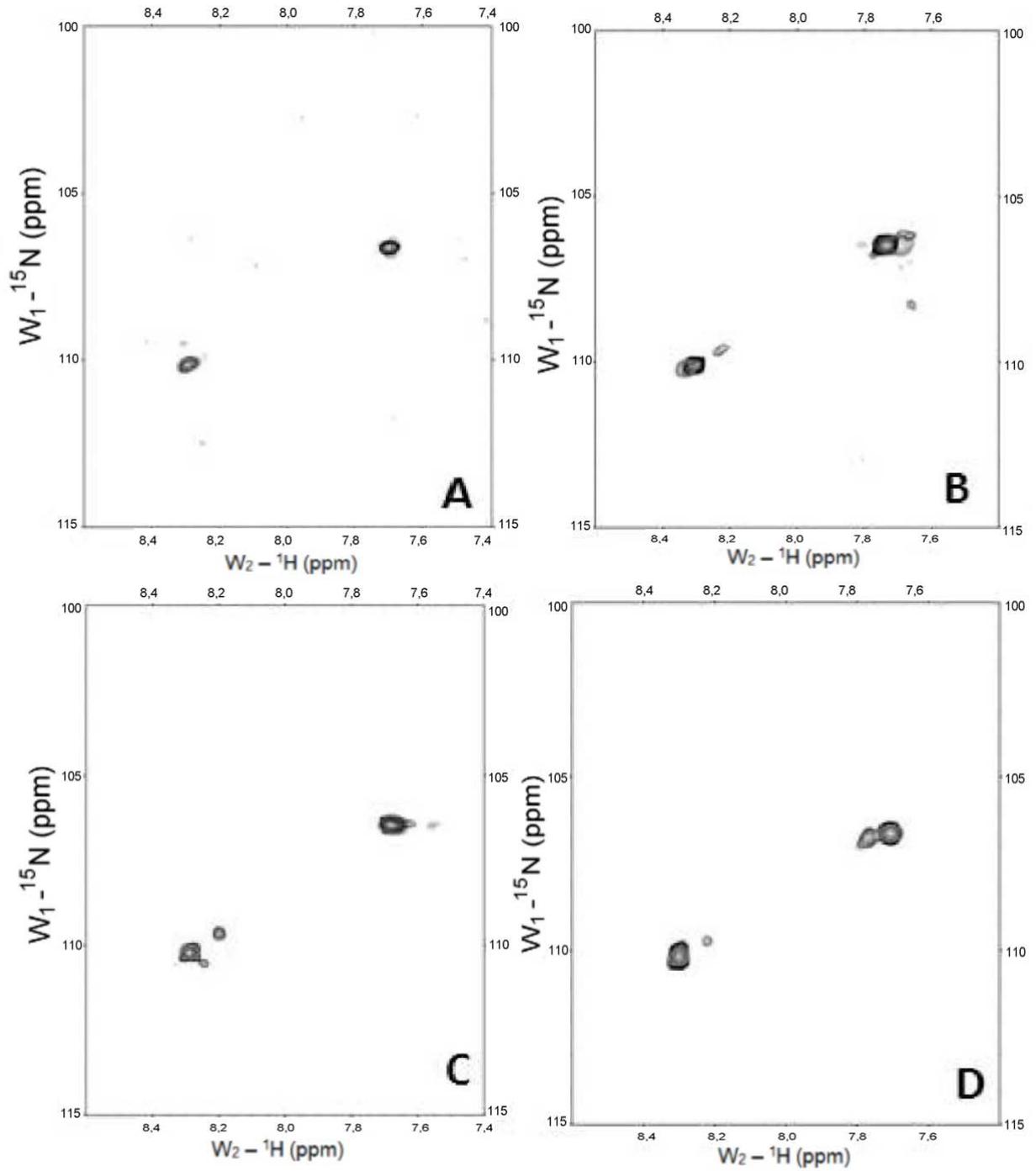


Figura 11

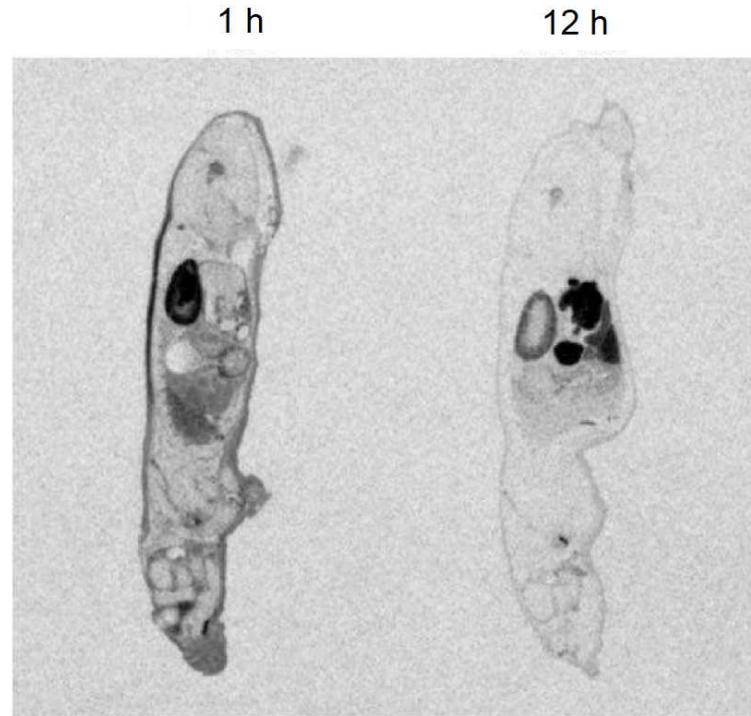


Figura 12

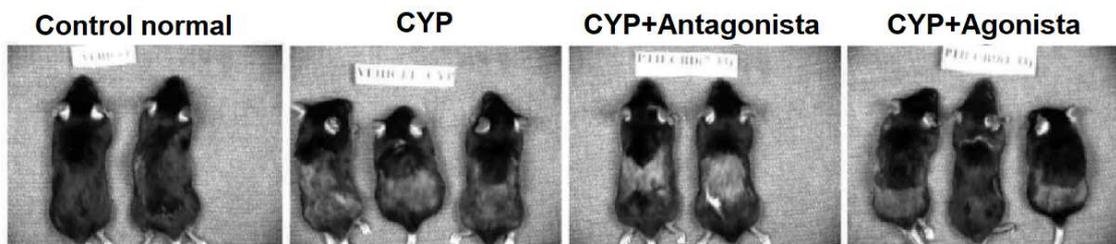
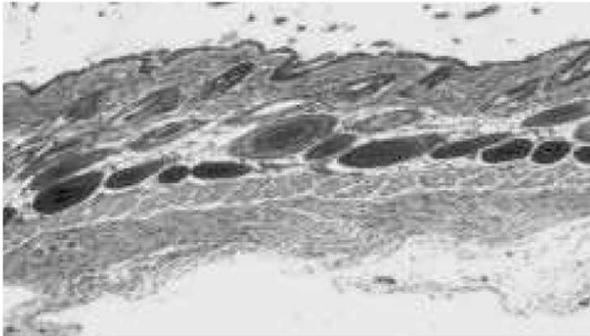
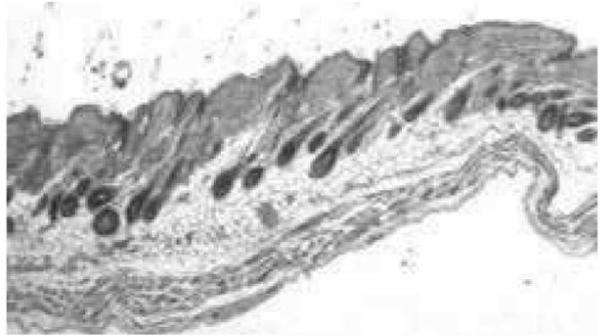


Figura 13

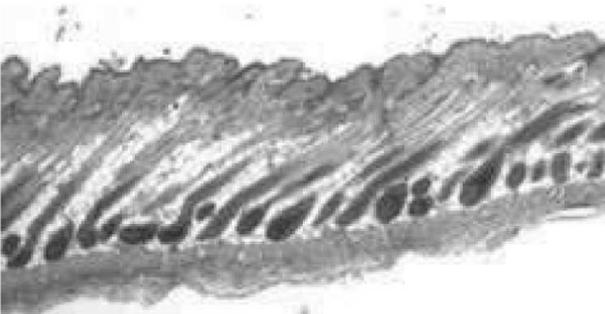
A) Control normal



B) CYP



C) CYP + Agonista



D) CYP + Antagonista



Figura 14

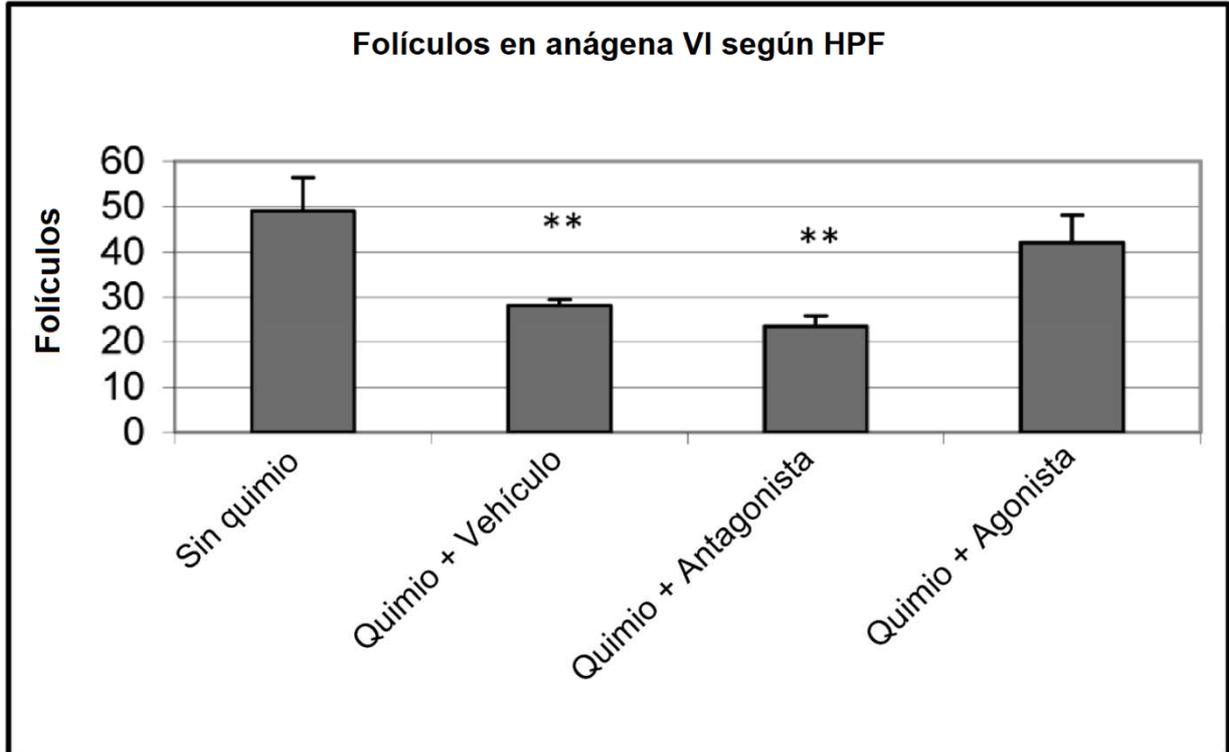
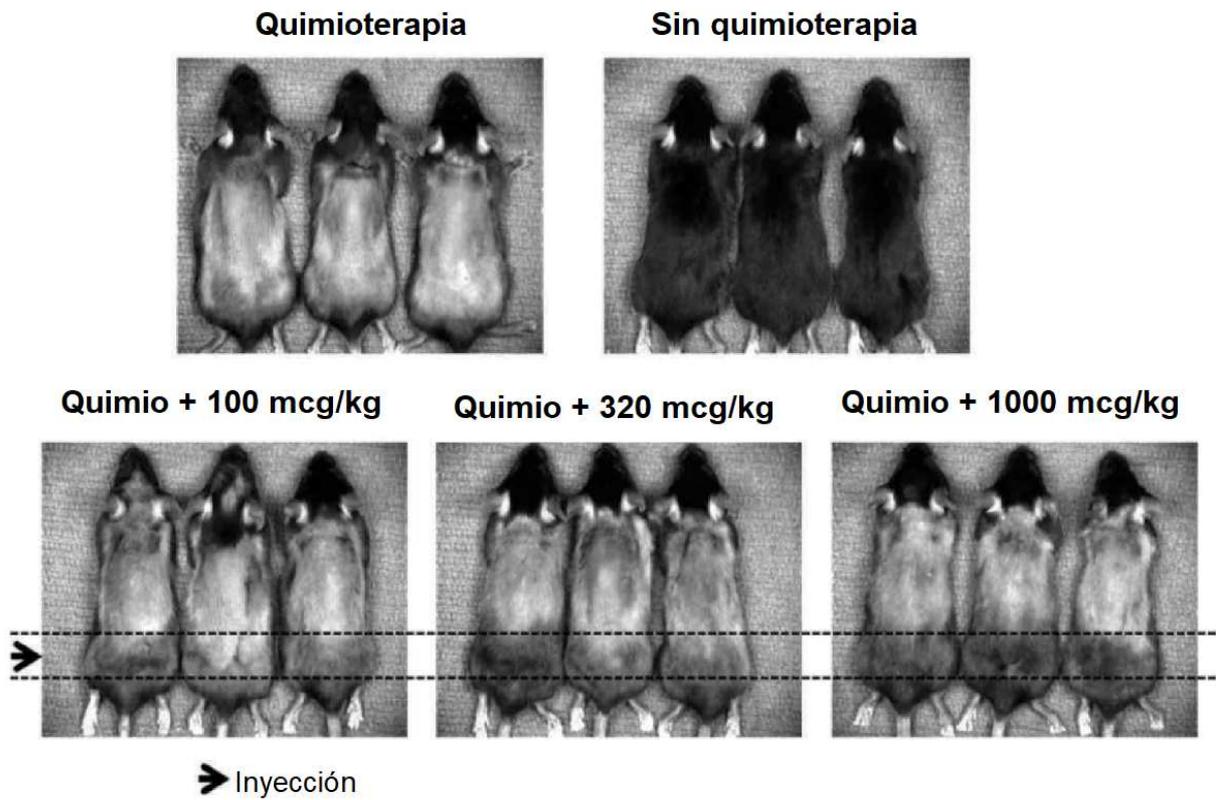


Figura 15



**Análisis en escala de grises en el sitio de inyección**

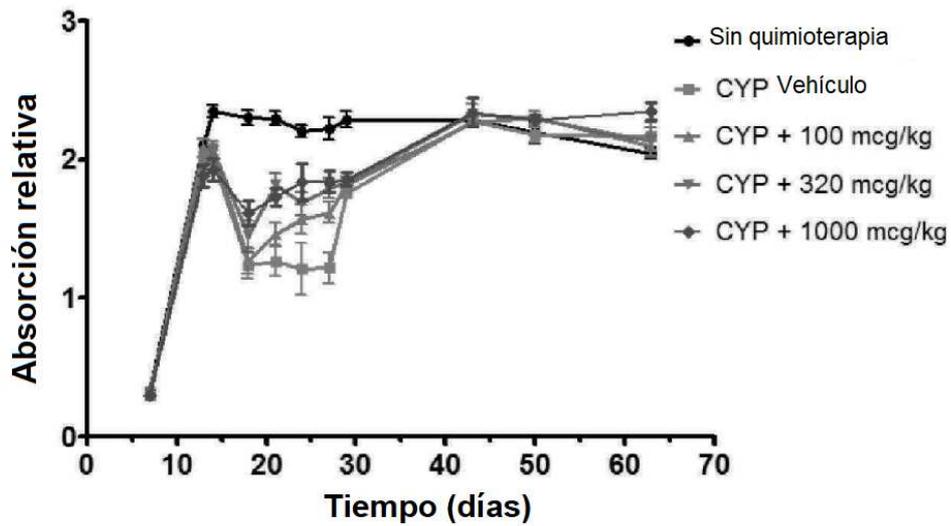


Figura 16

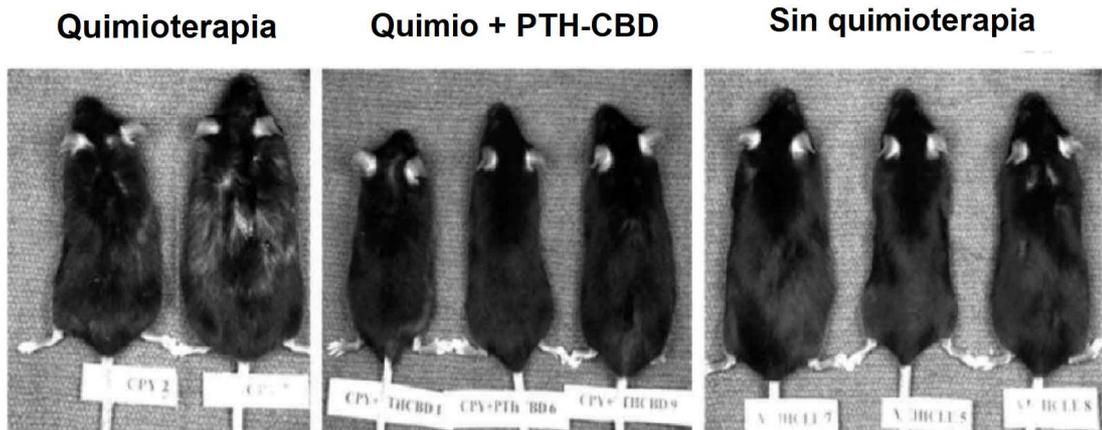
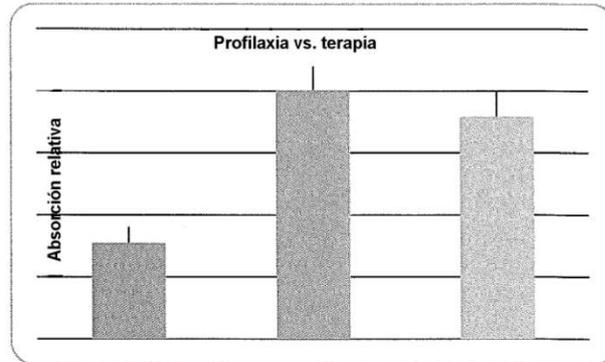
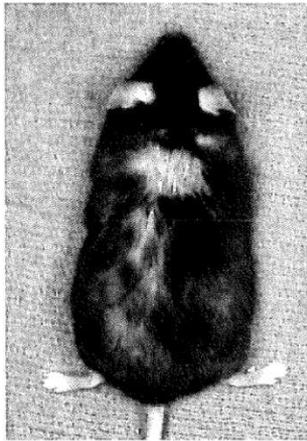


Figura 17



**Quimioterapia**



**Profilaxia**



**Terapia**

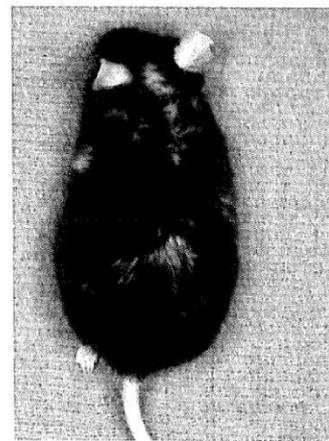


Figura 18

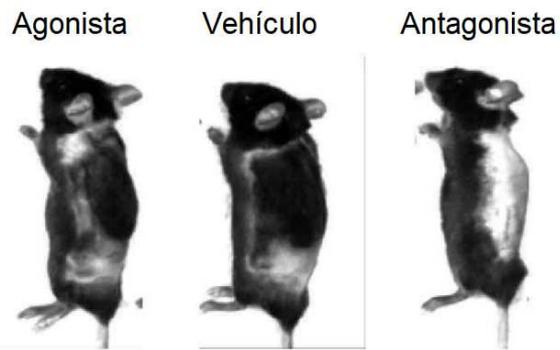


Figura 19

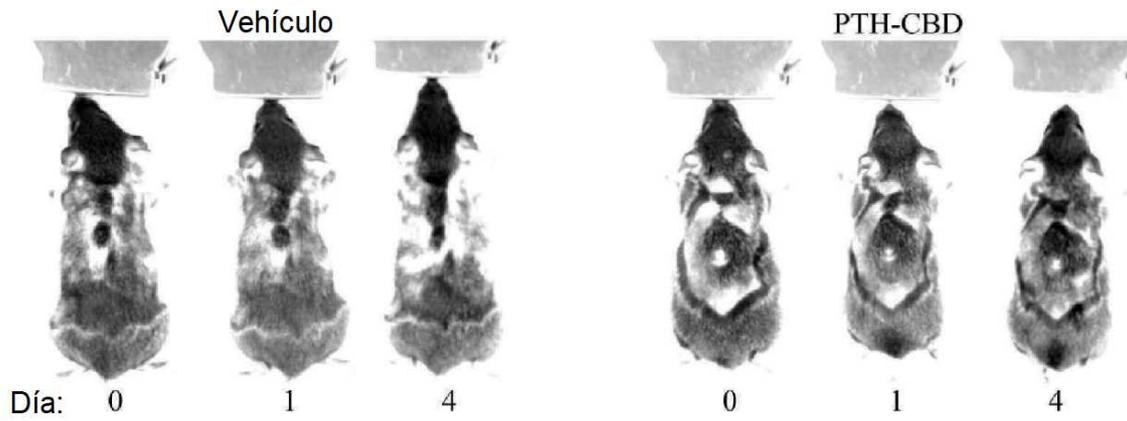


Figura 20

