

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 009**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012** **E 18173596 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020** **EP 3391899**

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:
31.03.2021

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 2 816 009 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 sitios del organismo de un sujeto donde se necesita un agente terapéutico concreto para que sea eficaz, es 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 afrontar 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 collagenopatías 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 agente terapéutico para su uso en el tratamiento de una collagenopatía en un sujeto que necesite tratamiento con el agente terapéutico, en donde el agente terapéutico no es un antagonista del receptor PTH/PTHrP y en donde la collagenopatía se caracteriza por sitios de colágeno parcialmente desenrollados o poco enrollados.

En el presente documento se divulgan 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 Ca^{2+} y los de color naranja son fundamentales para colocar los residuos de unión a 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°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°C/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 [PROXYL-(POG)₃POA(POG)₆]₃:CBD (Rojo), complejo [PROXYL-(POG)₄POA(POG)₅]₃:CBD (Azul), complejo [PROXYL-(POG)₅POA(POG)₄]₃:CBD (Verde), complejo [PROXYL-(POG)₆POA(POG)₃]₃:CBD (Naranja) y complejo [11PROXYL-(POG)₃PCG(POG)₄]₃: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 ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [(POG)₁₀]₃: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 ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [PROXYL-(POG)₆POA(POG)₃]₃: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 [PROXYL-(POG)₆POA(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 ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [(POG)₁₀]₃: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 ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [PROXYL-(POG)₅POA(POG)₄]₃: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 [PROXYL-(POG)₅POA(POG)₄]₃. La Figura 6D muestra una superposición del espectro HSQC ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [(POG)₁₀]₃: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 ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [PROXYL-

(POG)₄POA(POG)₅: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 ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N de [(POG)₄POA(POG)₅: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 ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [(POG)₁₀: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 ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [PROXYL-(POG)₃POA(POG)₆: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)₃POA(POG)₆:CBD (rojo).

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:CBD (negro), [PROXYL-(POG)₃POA(POG)₆:CBD (rojo), [PROXYL-(POG)₅POA(POG)₄:CBD (azul), [PROXYL-(POG)₄POA(POG)₅:CBD (verde), y [PROXYL-(POG)₃POA(POG)₆:CBD (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 ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [(POG)₁₀: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 ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [(POG)₄POA(POG)₅C-PROXYL]: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 ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N de [(POG)₄POA(POG)₅C-carbamidometil]: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)₄POA(POG)₅C-PROXYL]. Las resonancias de la amida de S906, S997 y G998 (rojo) desaparecieron tras titulación con [(POG)₄POA(POG)₅C-PROXYL]. La Figura 8E muestra una superposición del espectro HSQC ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [(POG)₁₀: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 ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [11PROXYL-(POG)₃PCG(POG)₄: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. La Figura 8G muestra una superposición del espectro HSQC ¹H-¹⁵N de CBD (negro) y del espectro HSQC ¹H-¹⁵N de [(POG)₃PCG(POG)₄: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)₃PCG(POG)₄:CBD. 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)₃POA(POG)₆:CBD, (B) complejo [PROXYL-(POG)₄POA(POG)₅:CBD, (C) complejo [PROXYL-(POG)₅POA(POG)₄:CBD y (D) complejo [PROXYL-(POG)₆POA(POG)₃:CBD, (E) complejo [(POG)₄POA(POG)₅C-PROXYL]:CBD, (F) [(POG)₄POA(POG)₅C-carbamidometil]:CBD. Los sitios de la mutación Gly→Ala están destacados. Las Figuras 9G y 9H muestran dos modos de unión probables del complejo [11PROXYL-(POG)₃PCG(POG)₄:CBD.

La Figura 10 es un conjunto de gráficas que muestran los datos de RMN HSQC usando las interacciones CBD - péptido colagenoso. La Figura 10A es una superposición del espectro HSQC ¹H-¹⁵N de [POGPO-¹⁵N-G-(POG)₈:CBD (negro) con el espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [POGPO-¹⁵N-G-(POG)₈:CBD (rojo) en una relación 1:1. La Figura 10B muestra una superposición del espectro HSQC ¹H-¹⁵N de [POGPO-¹⁵N-G-(POG)₂-POA(POG)₅:CBD (negro) con el espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [POGPO-¹⁵N-G-(POG)₂-POA(POG)₅:CBD (rojo) en una relación 1:1. La Figura 10C muestra una superposición del espectro HSQC ¹H-¹⁵N de [(POG)₈-PO-¹⁵N-G-POG]₃ (negro) con el espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [(POG)₈-PO-¹⁵N-G-POG]₃:CBD (rojo) en una relación 1:1. La Figura 10D muestra una superposición del espectro HSQC ¹H-¹⁵N de [(POG)₄-POA-PO-¹⁵N-G-POG]₃ (negro) con el espectro HSQC ¹H-¹⁵N del complejo [(POG)₄-POA-PO-¹⁵N-G-POG]₃:CBD (rojo) en una relación 1:1.

La Figura 11 muestra la distribución en el tejido de S³⁵ -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

foliculos 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.

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.

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 recrecimiento del cabello en un modelo de alopecia areata después del tratamiento con un control o con PTH-CBD.

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

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.

Además, se proporcionan métodos para tratar collagenopatías, 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 collagenopatía. Las collagenopatías 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.

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.

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 collagenasa u otra proteína tal como en la SEQ ID NO: 2, una etiqueta de GST o de His, o un enlazador de Ser o Gly.

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 NO: 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 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 esclerostina, hormona de crecimiento, IGF-1, VEGF, TGF- β , KGF, FGF-10, TGF- α , TGF- β 1, receptor TGF- β , 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.

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.

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.

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.

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.

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.

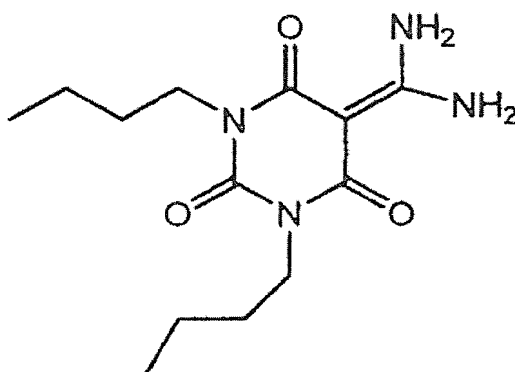
El segmento polipeptídico agonista del receptor PTH/PTHrP es un segmento polipeptídico PTH o PTHrP. Una isoforma humana de PTH es la SEQ ID NO:7. Una isoforma humana de PTHrP es la SEQ ID NO:8. Aunque se proporcionan isoformas humanas, los expertos en la materia apreciarán que también se pueden utilizar 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.

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 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, una

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.

5 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
10 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
15 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
20 antagonistas de PTH enlazados a un dominio de unión a colágeno derivado de la collagenasa 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
25 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
30 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
35 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
40 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
45 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,
50 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,
55 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
60 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
65 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.

- 5 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.
- 10 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 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 20 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 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.
- 25 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 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.
- 30 Se apreciará que la dosificación específica administrada en cualquier caso dado se ajustará de acuerdo con las 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 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.
- 35 40 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 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.
- 45 50 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 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 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.
- 55 60 65

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 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.

Ejemplos

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

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 ^1H - ^{15}N heteronuclear de coherencia de cuanto único (RMN HSQC) con CBD marcado con ^{15}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}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}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.

Materiales y métodos:

Producción de proteínas marcadas con ^{15}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}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).

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) metoxycarbonil (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 secuenciante 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 5C₁₈ 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.

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 termocontrolador 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 $[\theta]_{\text{mrw}}$. 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.

Espectroscopía 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_2 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 ^1H - ^{15}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).

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.

Péptidos	T_m (°C)	SEQ ID NO:
(POG) ₄ POA(POG) ₅	29	38
PROXYL-(POG) ₄ POA(POG) ₅	29	38
PROXYL-(POG) ₃ POA(POG) ₆	28	39
PROXYL-(POG) ₅ POA(POG) ₄	28	37
PROXYL-(POG) ₆ POA(POG) ₃	27	36
(POG) ₄ POA(POG) ₅ C-PROXYL	30	41
$^{11}\text{PROXYL}$ -(POG) ₃ PCG(POG) ₄	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_2 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_2 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 $\mu\text{l/s}$ 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 $0,005 < q < 0,198 \text{ \AA}^{-1}$, 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 personalizado y que funcionaba en el intervalo de transferencia de momento de $0,191 < q < 1,8 \text{ \AA}^{-1}$. 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_g , se obtuvo con la aproximación Guinier por ajuste de mínimos cuadrados en la región $QR_g < 1$, 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_{max} 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

DAMAVAR. Svergun, D. (2003) *J Appl Crystallogr* 36. Los modelos atómicos representados como una configuración compacta interconectada de esferas de diámetro $D_{\text{máx}}$ se ajustaron a los datos experimentales $I_{\text{exp}}(s)$ para minimizar el error. Los modelos atómicos se acoplaron a envolventes *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^a). Se generaron otras moléculas de minicolágeno desenrolladas por modificación de 1CAG usando fragmentos derivados de la estructura [(POG)₁₀]₃ (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)₆POA(POG)₃]₃ (SEQ ID NO: 36) que tiene Ala en la posición 21^a 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 ¹H-¹⁵N se realizaron con [PROXYL-(POG)₆POA(POG)₃]₃ (SEQ ID NO: 36) y CBD marcado con ¹⁵N 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 ¹H-¹⁵N de CBD (Fig. 5A y 5B). Cuando el complejo [PROXYL-(POG)₆POA(POG)₃]₃ (SEQ ID NO: 36):CBD se redujo con ácido ascórbico, estos tres restos reaparecieron en el espectro HSQC ¹H-¹⁵N. La desaparición de estos tres restos fue coherente con la titulación de [PROXYL-G(POG)₇]₃ (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 CBD se dirige al sitio sustituido Gly→Ala. Si CBD solo se hubiera unido al extremo C del [PROXYL-(POG)₆POA(POG)₃]₃ (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)₇(PRG)₃]₃ (SEQ ID NO: 43). La desaparición de los restos (V973, G975 y S979) situados en un lado distal del sitio de unión a Ca²⁺ (Fig. 5C) confirmó que el CBD 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)₃]₃ (SEQ ID NO: 44). Los resultados de la RMN implican que el CBD se une a la región poco enrollada [(POG)₂POA]₃ (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)₅POA(POG)₄]₃ (SEQ ID NO: 37) (Ala en la posición 18^a desde el extremo N del PROXYL), [PROXYL-(POG)₄POA(POG)₅]₃ (SEQ ID NO: 38) (Ala en la posición 15^a desde el extremo N del PROXYL), y [PROXYL-(POG)₃POA(POG)₆]₃ (SEQ ID NO: 39) (Ala en la posición 12^a 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 ¹H-¹⁵N. 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)₂POA]₃ (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 la alanina	Restos desaparecidos debido al PROXYL
1	Blanco [(POG) ₁₀] ₃ (SEQ ID NO: 35)		
	PROXYL en el extremo N		

(continuación)

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

La conformación helicoidal tanto de [(POG)₂POA]₃ (SEQ ID NO: 45) y el extremo C [(POG)₃]₃ (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 κ . El valor de κ oscila alrededor de un valor medio de -103° para [(POG)₁₀]₃ (SEQ ID NO: 35). Bella (2010) *J Struct Biol* 170, 377-391. El extremo C de un minicolágeno está poco enrollado (desplazamiento del valor κ de -103° a -110°) 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 κ de -103° a -115°) en el sitio de sustitución seguido por un enrollamiento superior a la norma. Como la región [(POG)₂POA]₃ (SEQ ID NO: 45) está algo menos enrollada que el extremo C [(POG)₃]₃ (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.

CBD también se dirige al extremo C del minicolágeno poco enrollado: Para demostrar que el extremo CBD se une al extremo C (POG)₃ (SEQ ID NO: 44) también, se sintetizó un péptido colagenoso [(POG)₄POA(POG)₅-PROXYL]₃ (SEQ ID NO: 38). [(POG)₄POA(POG)₅-C-PROXYL]₃ (SEQ ID NO: 41) se tituló con CBD marcado con ¹⁵N 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)₇-C-PROXYL]₃ (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)₂POA (SEQ ID NO: 45) del péptido colagenoso, CBD también se une al extremo C (POG)₃ (SEQ ID NO: 44). Como se describe, la conformación helicoidal tanto de la región (POG)₂POA (SEQ ID NO: 45) como del extremo (POG)₃ (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.

Para demostrar la capacidad del CBD para unirse tanto a la región (POG)₂POA (SEQ ID NO: 45) como a la región del extremo C (POG)₃ (SEQ ID NO: 44), se sintetizó un péptido colagenoso [11PROXYL-(POG)₃PCG(POG)₄]₃ (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 ¹H-¹⁵N 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)₃ (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)₃ (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.

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)₄POA(POG)₅]₃ (SEQ ID NO: 38), [(POG)₄POA(POG)₅C-carbamidometil]₃ (SEQ ID NO: 41), y [(POG)₃PCG(POG)₄]₃ (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)₁₀]₃ (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.

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)₄POA(POG)₅-PROXYL]₃(SEQ ID NO: 38):CBD y [11PROXYL-(POG)₃PCG(POG)₄]₃(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)₁₀]₃(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_{máx}) 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 _H)	Peso molecular aparente (M _w)	Radio de giro (R _g)	Diámetro máx. (D _{máx})
1	CBD:[(POG) ₁₀] ₃ (SEQ ID NO: 35)	3	43	22,62 ± 0,04	93
2	CBD:[PROXYL-(POG) ₆ POA(POG) ₃] ₃ (SEQ ID NO: 36)	3	44	24,67 ± 0,09	87
3	CBD:[PROXYL-(POG) ₅ POA(POG) ₄] ₃ (SEQ ID NO: 37)	3	42	21,08 ± 0,02	90
4	CBD:[PROXYL-(POG) ₄ POA(POG) ₅] ₃ (SEQ ID NO: 38)	3	43	25,48 ± 0,08	92
	CBD:[(POG) ₄ POA(POG) ₅] ₃ (SEQ ID NO: 38)	3	43	24,45 ± 0,14	85
5	CBD:[PROXYL-(POG) ₃ POA(POG) ₆] ₃ (SEQ ID NO: 39)	3	42	21,97 ± 0,14	94
6	CBD:[(POG) ₄ POA(POG) ₅ C-PROXYL] ₃ (SEQ ID NO: 41)	3	44	24,09 ± 0,16	85
	CBD: [(POG) ₄ POA(POG) ₅] ₃ (SEQ ID NO: 38)	3	42	24,67 ± 0,1	84
7	CBD:[11PROXYL-(POG) ₃ PCG(POG) ₄] ₃ (SEQ ID NO: 40)	3	42		96
	CBD:[(POG) ₃ PCG(POG) ₄] ₃ (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)₃ (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)₂POA (SEQ ID NO: 45) preferentemente al extremo C (POG)₃ (SEQ ID NO: 44) (Figs. 9A-F). Por ejemplo, el

modelo de acoplamiento para el CBD:[(POG)₄POA(POG)₅]₃ (SEQ ID NO: 38) construido usando la estructura cristalina del CBD (n.º de registro pdb 1NQD) interactúa con la región (POG)₂POA (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)₃ (SEQ ID NO: 44) de [(POG)₄POA(POG)₅-PROXYL]₃ (SEQ ID NO: 38), CBD se une predominantemente a la región (POG)₂POA (SEQ ID NO: 45) del péptido (Figs. 9E y 9F).

Las estructuras derivadas de los perfiles SAXS usando cálculos de hibridación simulada para [11PROXYL-(POG)₃PCG(POG)₄]₃ (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)₃PCG(POG)₄]₃ (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)₃ (SEQ ID NO: 44) o al extremo C (POG)₃ (SEQ ID NO: 44) (Figs. 9G y 9H).

Poco cambio estructural del ¹⁵N-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 ¹⁵N cerca del extremo N o C de [(POG)₁₀]₃ (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 ¹H-¹⁵N.

Tabla 4: Minicolágeno marcado con ¹⁵ N		SEQ ID NO:
A	POGPOG*POGPOGPOGPOGPOGPOGPOGPOG	35
B	POGPOGPOGPOGPOGPOGPOGPOGPOG*POG	35
C	POGPOG*POGPOGPOAPOGPOGPOGPOGPOG	38
D	POGPOGPOGPOGPOAPOGPOGPOGPOG*POG	38
* indica glicina marcada con ¹⁵ N, A indica sustitución Gly→Ala.		

Los péptidos marcados con ¹⁵N-Gly mostraron dos picos de cruce diferentes en el espectro HSQC ¹H-¹⁵N (Figs. 10A y 10B). Estos picos de cruce corresponden a las conformaciones de monómero desenrollado y triple hélice asignadas en estudios anteriores con RMN. Liu, et al.(1996) *Biochemistry* 35, 4306- 4313 y Li, et al. (1993) *Biochemistry* 32, 7377-7387. El resto Gly más cercano a los tripletes del extremo presenta picos tanto de monómero como de trímero en el espectro HSQC, mientras que el resto Gly en el centro de la triple hélice muestra un pico de cruce del trímero más intenso. Si el CBD va a flexar o producir cualquier desenrollado de la triple hélice tras la unión, los inventores esperan que el pico de cruce correspondiente a la triple hélice experimente engrosamiento de línea y desaparezca durante la titulación, y que el pico de cruce correspondiente al monómero se intensifique. Sin embargo, durante la titulación, CBD no instigó ningún cambio en los espectros HSQC ¹H-¹⁵N de los péptidos colagenosos. Por tanto, el CBD unido al extremo C (POG)₃ (SEQ ID NO: 35) impuso pocos cambios estructurales en la triple hélice.

Una molécula de minicolágeno no enrollada marcada selectivamente con ¹⁵N-Gly cerca de los extremos N o C (Tabla 4C y D) se tituló con CBD no marcado CBD. Los picos de cruce correspondiente al monómero y a la triple hélice se identificaron en los espectros HSQC (Figs 10C y 10D). La titulación del CBD no marcado indujo pocos cambios en la intensidad del pico de cruce del monómero o del trímero. Incluso después de la unión al minicolágeno parcialmente desenrollado, CBD no inicia ningún desenrollado adicional.

El CBD se une unidireccionalmente al sitio poco enrollado de la triple hélice del colágeno. El CBD puede ayudar a disolver las fibrillas de colágeno, pero no desenrolla la triple hélice. El direccionamiento a regiones poco enrolladas del tropocolágeno podría evitar la barrera de energía necesaria para desenrollar las triples hélices. Cuando el CBD se utiliza como molécula de administración de fármaco, la molécula inyectada se distribuye rápidamente a las placas finales de los discos vertebrales, cerca de las placas de crecimiento de la tibia y la fíbula, y también a la piel. Podría descargar su carga hacia el colágeno en sangre más accesible que está experimentando remodelación, por tanto rico en regiones poco enrolladas.

Ejemplo 2: Comparación estructural entre los dominios de unión a colágeno ColH y ColG

El dominio de unión a colágeno (CBD) del extremo C de la colagenasa es necesario para la unión a las fibrillas de colágeno insolubles y para la posterior colagenolisis. En las estructuras cristalinas de alta resolución de ColG-CBD (s3b) y ColH-CBD (s3) se parecen mucho entre sí (r.m.s.d. C_α = 1,5 Å), a pesar de compartir solamente el 30 % de identidad de secuencia. Cinco de los seis restos quelantes del Ca²⁺ se conservan. Los sitios de unión dobles a Ca²⁺ de s3 se completan con un aspartato equivalente funcionalmente. Los tres restos más críticos para la interacción con el colágeno en s3b están conservados en s3. La forma general del bolsillo de unión se retiene mediante estructuras de bucle alteradas y posiciones en la cadena lateral. Los datos de dispersión de rayos x de ángulo pequeño revelaron que s3 también se une asimétricamente al minicolágeno. Además de los sitios de unión al calcio y del bolsillo de unión al colágeno, los restos hidrófobos arquitectónicamente importantes y la red de enlaces de hidrógeno

alrededor del péptido unión en *cis* están bien conservadas en la subfamilia de la metalopeptidasa M9B.

Los rasgos estructurales comunes descritos anteriormente y en Bauer et al. (2012) J Bacteriol November, permitieron a los inventores actualizar el alineamiento de secuencias del CBD en la subfamilia M9B (Fig. 1). Los restos conservados son importantes para uno de los cuatro motivos: quelación del calcio (rojo), isomerización *cis-trans* del enlazador (amarillo), unión a colágeno (azul) o plegado de la proteína (verde). La Fig. 1 también indica las hebras de la estructura a lo largo de la parte superior de la figura.

El sitio doble de unión a calcio se forma mediante cuatro restos quelantes (Glu899, Glu901, Asn903, y Asp904) dentro del extremo N del enlazador, dos restos quelantes (Asp927 y Asp930) de C de la hebra β y los enlaces de hidrógeno invariantes Tyr1002 y que orientan Asp930. Los números de resto usados en este párrafo son del s3b. Análogamente, otras estructuras de soporte como Gly921 están conservadas en el centro de la hebra β estratégicamente situadas para dejar sitio a Glu899. El sitio doble de quelación del calcio está formado a veces por restos funcionalmente equivalentes. Como se menciona anteriormente, Asp897 de s3 actúa equivalente a Asp927 de s3b. Se realizó un intento de identificar Asp897 equivalentes en s3a y s3b de *B. brevis*, A3 s3a de *C. botulinum* y ColG s3a de *C. histolyticum*. Los restos Asp y Glu tridentados y divalentes están conservados, con la única excepción de s3a de *C. sordellii*. El resto Asp904 monodentado está sustituido a veces por Asn. Para las moléculas sustituidas, la carga neta del sitio del calcio doble es neutra, en lugar de -1.

El péptido entre los restos 901-902 tiene conformación *cis* en el estado *holo* para s3b y s3. La posición 902 de otras moléculas CBD es Pro, Asp o Asn. Pro tiene frecuentemente éxito en la unión del péptido para facilitar la isomerización *trans-cis*. La molécula s3 tiene Pro. En s3b, OD de Asn902 tiende un enlace de hidrógeno al N de la cadena principal de Asp904. El enlace de hidrógeno es fundamental para la isomerización del péptido. Spiriti y van der Vaart. (2010) Biochemistry 49:5314-5320. Para el resto de las moléculas de CBD que tienen Asp en la posición, OD de Asp podría tener el mismo papel que Asn902. Otros enlaces de hidrógeno identificados mediante estudios de simulación importantes para estabilizar los estados de transición están bien conservados. Estos pares de donante-aceptor en s3 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)

Los restos no funcionales que son importantes para el plegado o para la estabilidad arquitectónica están conservados. Los restos hidrófobos empaquetados entre las β -láminas se conservan mejor si están situados cerca de restos funcionalmente críticos. Por ejemplo, el Trp956 invariante de la hebra E está empaquetado entre β -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 establezca 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 (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 α -hélice $\rightarrow$ β -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 β -láminas por interacción con ambas láminas. El β -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.

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. Y970A da como resultado una reducción de 12 veces en la unión al minicolágeno. Mediante titulación RMN HSQC ^{15}N , se ha descubierto que Thr957 interactúa con el minicolágeno. Los restos de aminoácidos β -ramificados o Leu se encuentran en las posiciones equivalentes a Thr957 en la mayoría de los CBD. En la titulación con RMN HSQC ^{15}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.

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 podría dirigirse a las regiones parcialmente poco enrolladas en el centro de un tropocolágeno que también sería vulnerable a asaltos.

Muy similar a s3b, s3 es al mismo tiempo compacto y extremadamente estable en presencia de 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 Ca^{2+} para disparar reordenamientos del dominio como medio de activación enzimática. La concentración de 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

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.

Distribución de PTH-CBD in vivo: La distribución en los tejidos se evaluó administrando PTH-CBD marcado con ^{35}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}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 μm) con un autocriotomo, se secaron a -20°C , y se expusieron a una placa de imagen durante 4 semanas. Parece que la distribución inicial de ^{35}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.

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 recrecimiento del pelo después de un tratamiento con PTH-CBD con menos interferencia derivada del recrecimiento 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.

- 5 **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
10 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.

15 **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
20 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
25 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

- 30 <110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS
MONTEFIORE MEDICAL CENTER
KITASATO UNIVERSITY
GENSURE, Robert C.
PONNAPAKKAM, Tulasi
35 KATIKANENI, Ranjitha
PHILOMINATHAN, Sagaya Theresa Leena
KOIDE, Takaki
MATSUSHITA, Osamu
SAKON, Joshua
40
<120> ADMINISTRACIÓN DE AGENTES TERAPÉUTICOS MEDIANTE UNA PROTEÍNA DE UNIÓN A COLÁGENO
45 <130> 5965-00035
<150> US 61/596.869
<151> 09/02/2012
50 <150> US 61/570.620
<151> 14/12/2011
<160> 47
<170> PatentIn versión 3.5
55 <210> 1
<211> 158
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
60 <220>
<223> Proteína de fusión sintética que contiene un segmento de la hormona paratiroidea y un dominio de unión a colágeno
65 <400> 1

ES 2 816 009 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 2 816 009 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

```

<210> 3

<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 gcaaattattc tgaaatgagc      180
tgttgacaat taatcatcgg ctcgataaat gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca      240
cacaggaaac agtattcatg tcccctatac taggttattg gaaaattaag ggccttgtgc      300
aaccactcgc acttcttttg gaatatcttg aagaaaaata tgaagagcat ttgtatgagc      360
gcgatgaagg tgataaatgg cgaaacaaaa agtttgaatt gggtttggag tttcccaatc      420
ttccttatta tattgatggt gatgttaaata taacacagtc tatggccatc atacgttata      480
tagctgacaa gcacaacatg ttgggtggtt gtccaaaaga gcgtgcagag atttcaatgc      540
ttgaaggagc ggttttggat attagatacg gtgtttcgag aattgcatat agtaaagact      600
ttgaaactct caaagttgat tttcttagca agctacctga aatgctgaaa atgttcgaag      660
atcgtttatg tcataaaaca tttttaaata gtgatcatgt aaccatcct gacttcatgt      720
tgtatgacgc tcttgatggt gttttataca tggacccaat gtgcctggat gcgttcccaa      780
    
```

10

ES 2 816 009 T3

aattagtttg	ttttaaaaaa	cgtattgaag	ctatcccaca	aattgataag	tacttgaaat	840
ccagcaagta	tatagcatgg	cctttgcagg	gctggcaagc	cacgtttggt	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	taccagggtat	acctgttagt	ggaaccatag	1140
aaaatacaag	tgatcaagat	tattttctatt	ttgatgttat	aacaccagga	gaagtaaaaa	1200
tagatataaa	taaattaggg	tacggaggag	ctacttgggg	agtatatgat	gaaaataata	1260
atgcagtatc	ttatgccact	gatgatgggc	aaaatttaag	tggaagttt	aaggcagata	1320
aaccaggtag	atattacatc	catctttaca	tgtttaatgg	tagttatatg	ccatatagaa	1380
ttaatataga	aggttcagta	ggaagataat	attttattag	ttgaggtaac	tccactcgaa	1440
ttggtcgact	cgagcgcccg	catcgtgact	gactgacgat	ctgcctcgcg	cgtttcggtg	1500
atgacggtga	aaacctctga	cacatgcagc	tcccgagagc	ggtcacagct	tgtctgtaag	1560
cggatgccgg	gagcagacaa	gcccgtcagg	gcgcgtcagc	gggtggtggc	gggtgtcggg	1620
gcgcagccat	gacccagtca	cgtagcgata	gcggagtgtg	taattcttga	agacgaaagg	1680
gcctcgtgat	acgcctattt	ttatagggtt	atgtcatgat	aataatgggt	tcttagacgt	1740
cagggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	gaacccttat	ttgtttattt	ttctaaatac	1800
attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	aacctgata	aatgcttcaa	taatattgaa	1860
aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgccct	tattcccttt	tttgcggcat	1920
tttgccttcc	tgtttttgct	cacccagaaa	cgctggtgaa	agtaaaagat	gctgaagatc	1980
agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaac	tggatctcaa	cagcggtaag	atccttgaga	2040
gttttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	tgagcacttt	taaagttctg	ctatgtggcg	2100
cggattatc	ccgtgttgac	gccgggcaag	agcaactcgg	tcgccgcata	cactattctc	2160
agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	tcttacggat	ggcatgacag	2220
taagagaatt	atgcagtgtc	gccataacca	tgagtgataa	cactgcggcc	aacttacttc	2280
tgacaacgat	cggaggaccg	aaggagctaa	ccgctttttt	gcacaacatg	ggggatcatg	2340
taactcgctt	tgatcggttg	gaaccggagc	tgaatgaagc	cataccaaac	gacgagcgtg	2400
acaccacgat	gcctgcagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	actattaact	ggcgaactac	2460
ttactctagc	ttccccggca	caattaatag	actggatgga	ggcggataaa	gttgcaggac	2520
cacttctgcg	ctcggccctt	cgggctggct	ggtttattgc	tgataaatct	ggagccgggtg	2580
agcgtgggtc	tcgcggtatc	attgcagcac	tggggccaga	tggttaagccc	tcccgtatcg	2640
tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	acgaaataga	cagatcgctg	2700

agataggtgc	ctcactgatt	aagcattggt	aactgtcaga	ccaagtttac	tcatatatac	2760
tttagattga	tttaaaactt	cattttttaat	ttaaaaggat	ctaggtgaag	atcctttttg	2820
ataatctcat	gaccaaaatc	ccttaacgtg	agttttcggt	ccactgagcg	tcagacccccg	2880
tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	gcgcgtaatc	tgctgcttgc	2940
aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcggtag	tttgtttgcc	ggatcaagag	ctaccaactc	3000
tttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcagatacc	aaatactgtc	cttctagtgt	3060
agccgtagtt	aggccaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	gcctacatac	ctcgctctgc	3120
taatcctggt	accagtggct	gctgccagtg	gcgataagtc	gtgtcttacc	gggttggaact	3180
caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	aacggggggt	tcgtgcacac	3240
agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	cctacagcgt	gagctatgag	3300
aaagcgccac	gcttcccga	gggagaaagg	cggacaggta	tccggtaagc	ggcagggctg	3360
gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	ctggtatctt	tatagtcctg	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
aggaagcgga	agagcgcctg	atgcggtatt	ttctccttac	gcatctgtgc	ggtatttcac	3720
accgcataaa	ttccgacacc	atcgaatggt	gcaaaacctt	tcgcggtatg	gcatgatagc	3780
gcccgaaga	gagtcaattc	agggtggtga	atgtgaaacc	agtaacgtta	tacgatgtcg	3840
cagagtatgc	cgggtgtctc	tatcagaccg	tttcccgcgt	ggtgaaccag	gccagccacg	3900
tttctgcgaa	aacgcgggaa	aaagtggaa	cggcgatggc	ggagctgaat	tacattccca	3960
accgcgtggc	acaacaactg	gcgggcaaac	agtcgttgct	gattggcggt	gccacctcca	4020
gtctggccct	gcacgcgccg	tcgcaaattg	tcgcggcgat	taaatctcgc	gccgatcaac	4080
tgggtgccag	cgtggtggtg	tcgatggtag	aacgaagcgg	cgtcgaagcc	tgtaaagcgg	4140
cgggtgcacaa	tcttctcgcg	caacgcgtca	gtgggctgat	cattaactat	ccgctggatg	4200
accaggatgc	cattgctgtg	gaagctgcct	gcactaatgt	tccggcggtta	tttcttgatg	4260
tctctgacca	gacacccatc	aacagtatta	ttttctccca	tgaagacggt	acgcgactgg	4320
gcgtggagca	tctggtcgca	ttgggtcacc	agcaaatcgc	gctgtagcgc	ggcccatata	4380
gttctgtctc	ggcgcgctct	cgtctggctg	gctggcataa	atatctcact	cgcaatcaaa	4440
ttcagccgat	agcggaacgg	gaaggcgact	ggagtgccat	gtccggtttt	caacaaacca	4500
tgcaaatgct	gaatgagggc	atcgttccca	ctgcgatgct	ggttgccaac	gatcagatgg	4560

ES 2 816 009 T3

```

cgctgggcg c aatgcgcgcc attaccgagt ccgggctgcg cgttggtgcg gatatactcgg 4620
tagtgggata cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccgccgtta accaccatca 4680
aacaggattt tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg cttgctgcaa ctctctcagg 4740
gccaggcggt gaagggaat cagctgttgc 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
ggccgtcggt ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc gttaccaac ttaatcgct 5100
tgcagcacat ccccttttcg ccagctggcg taatagcgaa gagggccgca ccgatcgccc 5160
ttoccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgcttt gcctggtttc cggcaccaga 5220
agcggtgccg gaaagctggc tggagtgcga tcttcctgag gccgatactg tcgtcgtccc 5280
ctcaaactgg cagatgcacg gttacgatgc gccatctac accaacgtaa cctatcccat 5340
tacggtcaat ccgccgtttg ttcccacgga gaatccgacg ggttggtact cgctcacatt 5400
taatgttgat gaaagctggc tacaggaagg ccagacgcga attatTTTTTg atggcggttg 5460
aatt 5464

```

<210> 4

<211> 383

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<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 2 816 009 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 2 816 009 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 2 816 009 T3

115																			
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 2 816 009 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 2 816 009 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 2 816 009 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
<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

Ala Lys Ser Gln

ES 2 816 009 T3

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

5

<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> Proteína de fusión sintética Gly-Ser-PTH(1-33)-CBD

<400> 9

20

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

ES 2 816 009 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 2 816 009 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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<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

<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
15 <213> *Clostridium histolyticum*

<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 2 816 009 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*
<400> 15

5

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 2 816 009 T3

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

5

<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 2 816 009 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.*

<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

ES 2 816 009 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		

<210> 20

<211> 111

<212> PRT

<213> *C. cerus*

<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		

ES 2 816 009 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 15

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 80

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 2 816 009 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*

<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

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

5

<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 2 816 009 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 2 816 009 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*

<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

ES 2 816 009 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*

<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

<210> 29

ES 2 816 009 T3

<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													

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

10

<400> 30

15

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 2 816 009 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

<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

Lys

<210> 32
<211> 113
<212> PRT
<213> *C. perfringens*

<400> 32

ES 2 816 009 T3

Ile Asn Glu Ser Glu Pro Asn Asn Asp Phe Glu Lys Ala Asn Gln Ile

1 5 10 15

Ala Lys Ser Asn Met Leu Val Lys Gly Thr Leu Ser Glu Glu Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

Thr Val Leu Lys Gly Glu Lys Thr Leu Glu Pro Gly Arg Tyr Tyr Leu
85 90 95

Ser Val Tyr Thr Tyr Asp Asn Gln Ser Gly Ala Tyr Thr Val Asn Val
100 105 110

Lys

<210> 33
<211> 113
<212> PRT
<213> *C. sordellii*

<400> 33

5

ES 2 816 009 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 2 816 009 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

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

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(30)
<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 35

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

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

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(30)
<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 36

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

Xaa Ala Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly 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

35 <400> 38

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 Pro Xaa Gly
20 25 30

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

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
50 <222> (1)..(30)
<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<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

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (1)..(24)
<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 40

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

20 <210> 41
<211> 31
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

30 <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

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
50 <222> (1)..(22)
<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 42

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

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly
20

5 <210> 43
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (1)..(31)
<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 43

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

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

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(9)
<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

35 <400> 44

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly
1 5

40 <210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(9)
50 <223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina

<400> 45

ES 2 816 009 T3

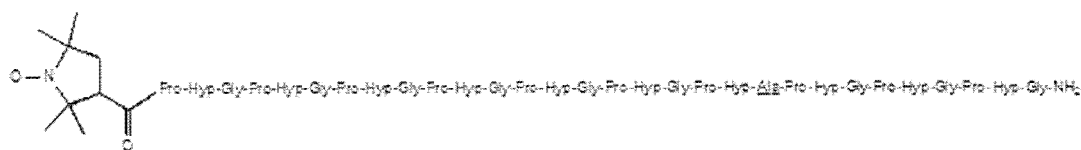
		Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Ala
		1 5
5	<210> 46	
	<211> 26	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Péptido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(26)	
15	<223> Cualquier Xaa es hidroxiprolina	
	<400> 46	
		Gly Pro Arg Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa 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: Etiqueta de GST	
	<400> 47	
30		Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly
		1 5

REIVINDICACIONES

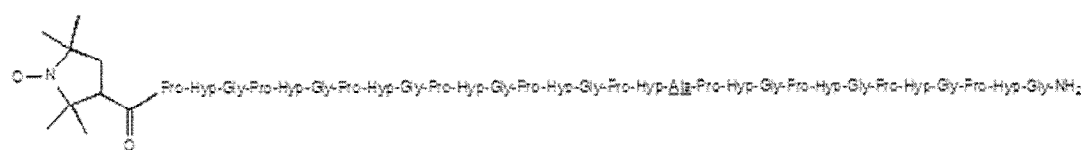
1. Una composición que comprende un segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano unido a un agente terapéutico, para su uso en el tratamiento de una colagenopatía en un sujeto que necesite tratamiento con el agente terapéutico, en donde el agente terapéutico no es un antagonista del receptor PTH/PTHrP, en donde el segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano administra el agente a sitios que comprenden colágeno parcialmente desenrollados o poco enrollados, y en donde la colagenopatía se **caracteriza por** sitios de colágeno parcialmente desenrollados o poco enrollados.
2. La composición para el uso según la reivindicación 1, en donde el agente terapéutico es un agente capaz de promover el crecimiento del hueso, disminuir la inflamación o promover la estabilidad del colágeno
3. La composición para el uso según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el agente terapéutico se selecciona del grupo que comprende BMP-2, BMP-3, FGF-2, FGF-4, anticuerpo contra esclerostina, hormona de crecimiento, IGF-1, VEGF, TGF- β , KGF, FGF-10, TGF- α , TGF- β 1, receptor de TGF- β , GM-CSF, EGF, PDGF y factores de crecimiento del tejido conectivo.
4. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano y el agente terapéutico están químicamente reticulados entre sí o son porciones polipeptídicas de una proteína de fusión.
5. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el agente terapéutico es un agonista del receptor PTH/PTHrP.
6. La composición para el uso según la reivindicación 5, en donde 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, los 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.
7. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la colagenopatía se selecciona del grupo que consiste en 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.
8. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el segmento polipeptídico de unión a colágeno de origen bacteriano comprende un polipéptido de unión a colágeno derivado de una peptidasa M9 seleccionada del grupo que consiste en *Clostridium*, *Bacillus* y *Vibrio*, una de las SEQ ID NO: 13-34 o un fragmento de las mismas, los residuos 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, o un péptido que es al menos un 90 % idéntico a los restos 34-158 de la SEQ ID NO: 1 o de las SEQ ID NO: 13-34.
9. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el agente terapéutico o 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 de agente terapéutico o del agonista del receptor de PTH/PTHrP.
10. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde 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.
11. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la composición está formulada para su administración por vía intramuscular, intradérmica, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, tópica, oral, parenteral o intranasal.
12. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el sujeto es un ser humano.
13. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la composición está formulada para administración en una solución acuosa a un pH inferior a aproximadamente 5,0.
14. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde la composición está formulada para administración en una solución acuosa a un pH superior a aproximadamente 6,0.

Figura 2

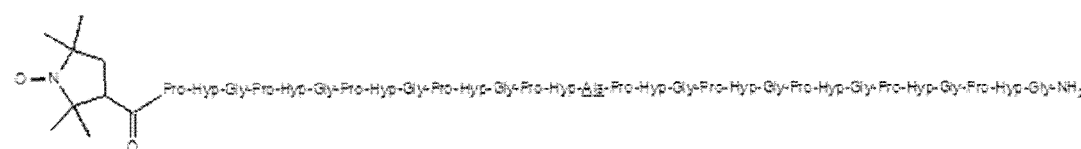
PROXYL-(POG)₆POA(POG)₃



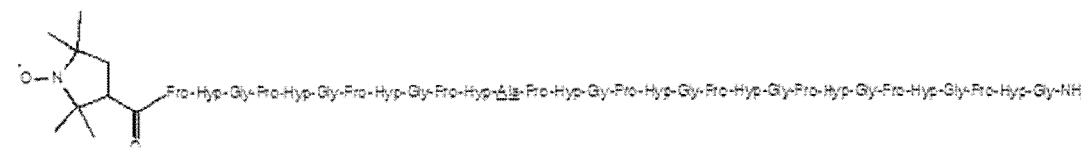
PROXYL-(POG)₅POA(POG)₄



PROXYL-(POG)₄POA(POG)₅

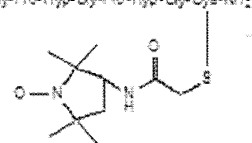


PROXYL-(POG)₃POA(POG)₆



(POG)₄POA(POG)₅C-PROXYL

H-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Cys-NH₂



¹¹PROXYL-(POG)₃PCG(POG)₄

H-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Cys-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-NH₂

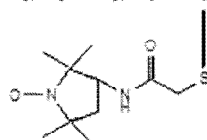


Figura 3A

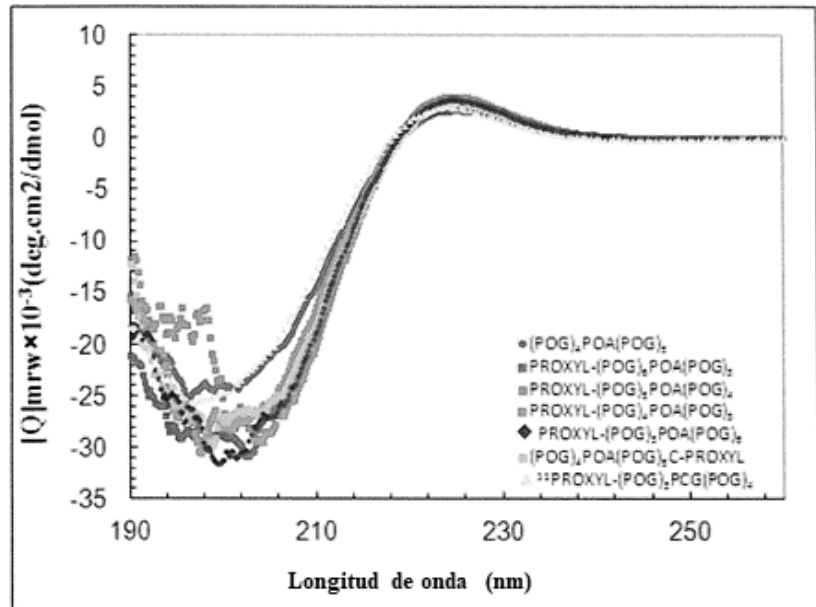


Figura 3B

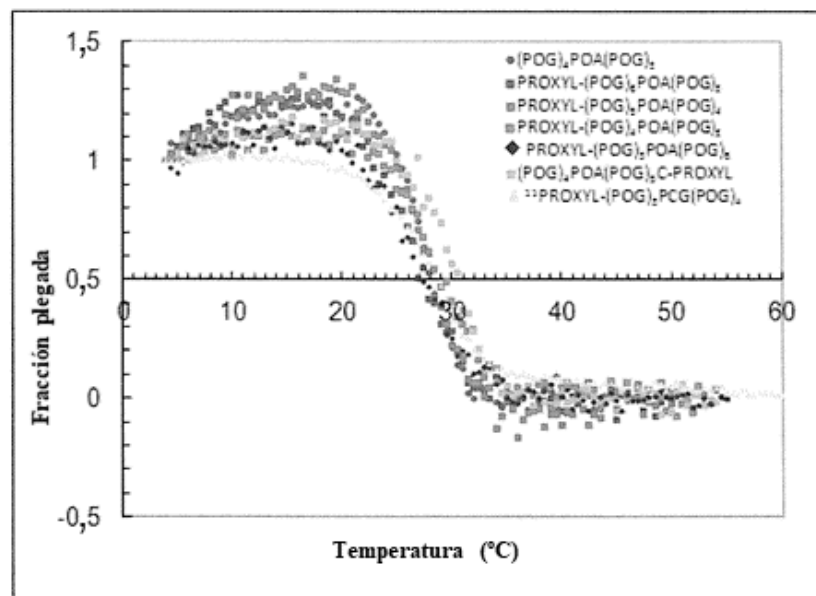


Figura 4

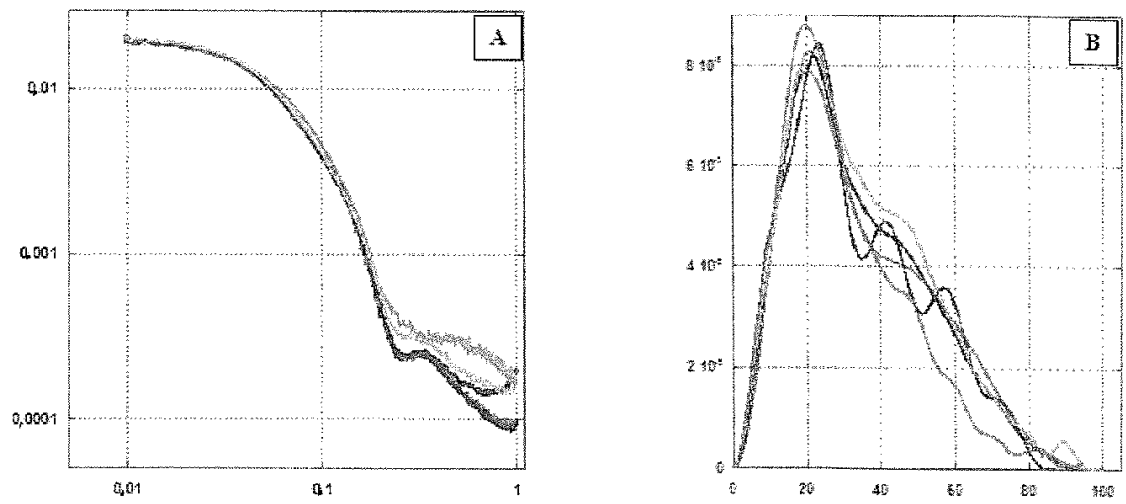


Figura 5

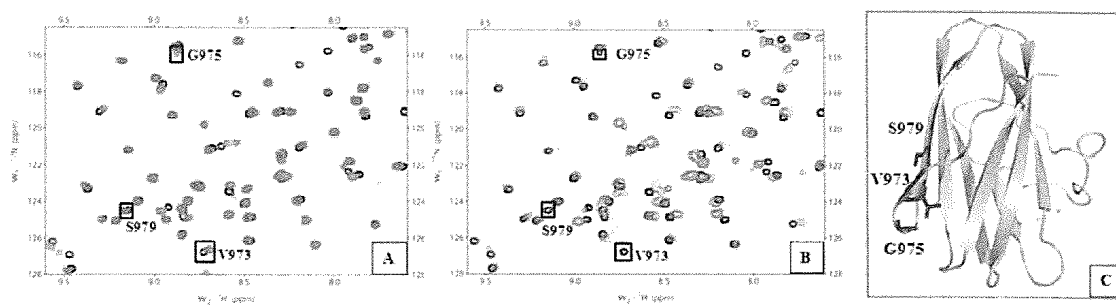


Figura 6

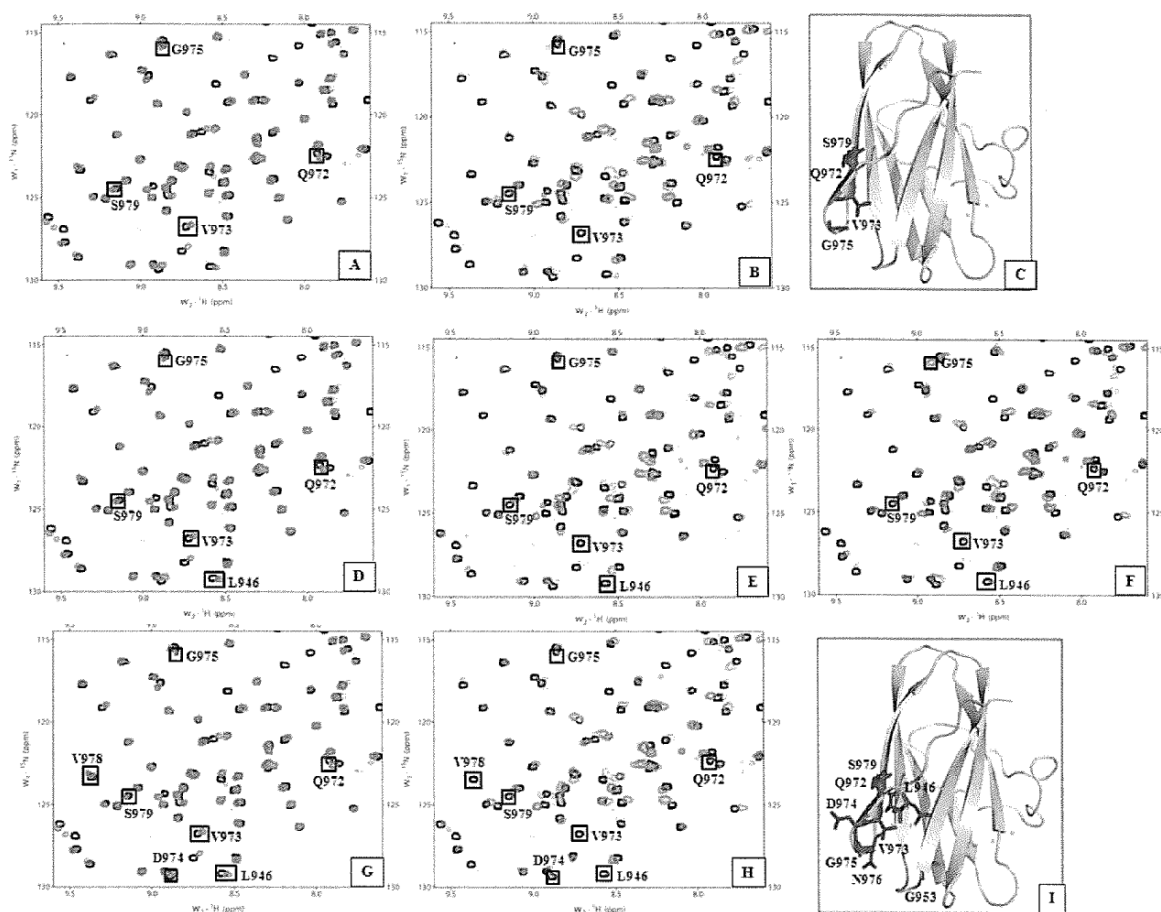


Figura 7

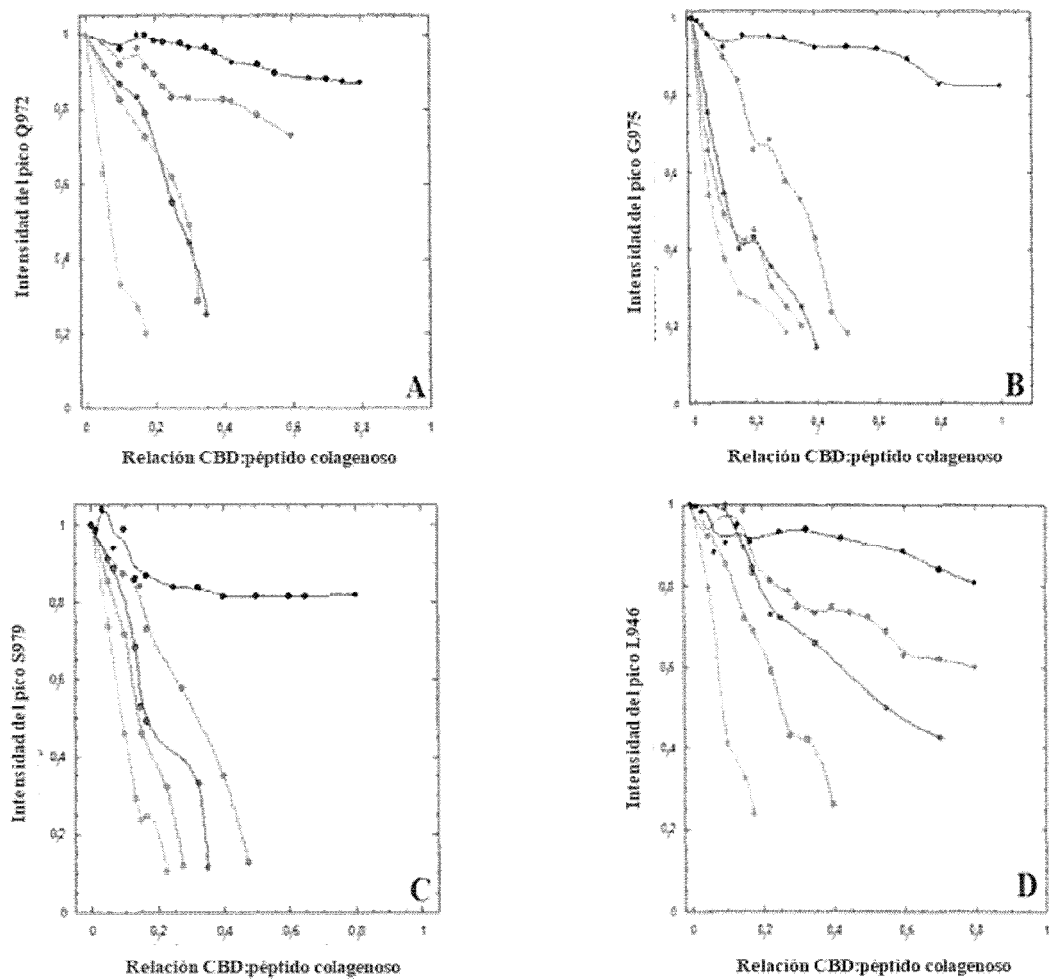


Figura 8

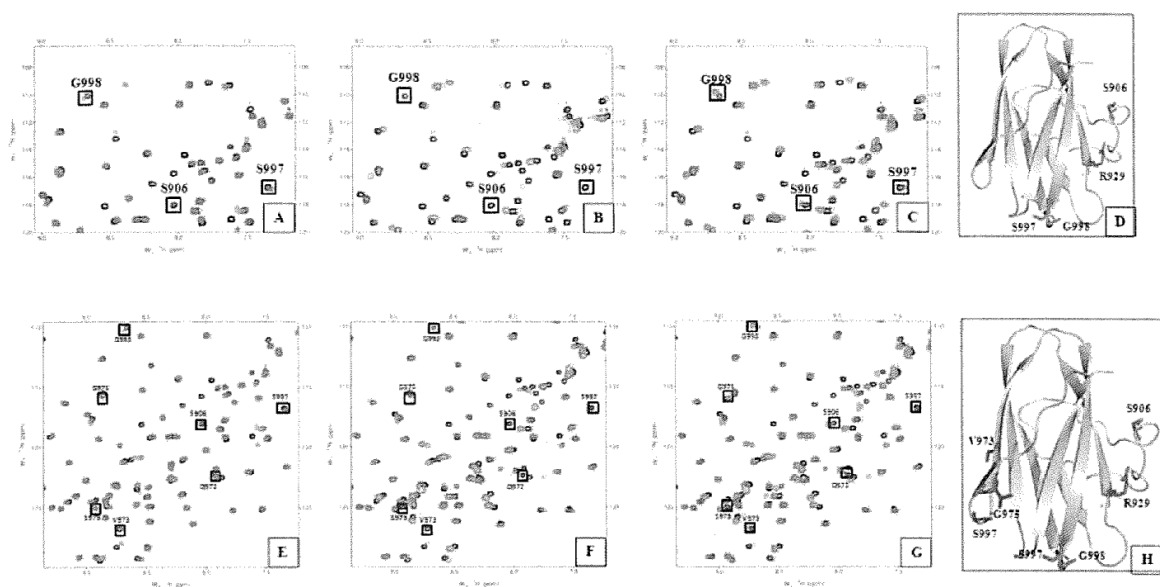


Figura 9

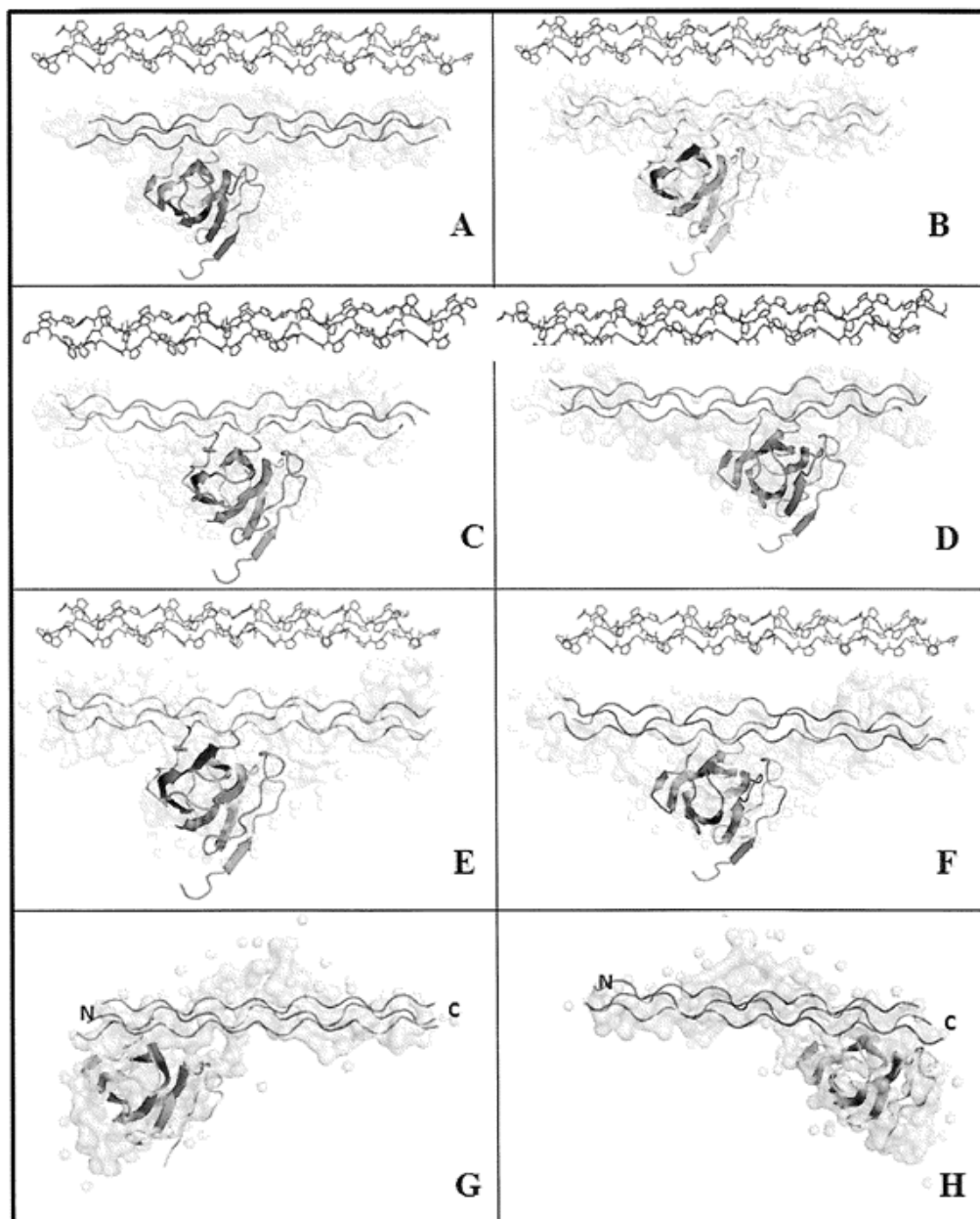


Figura 10

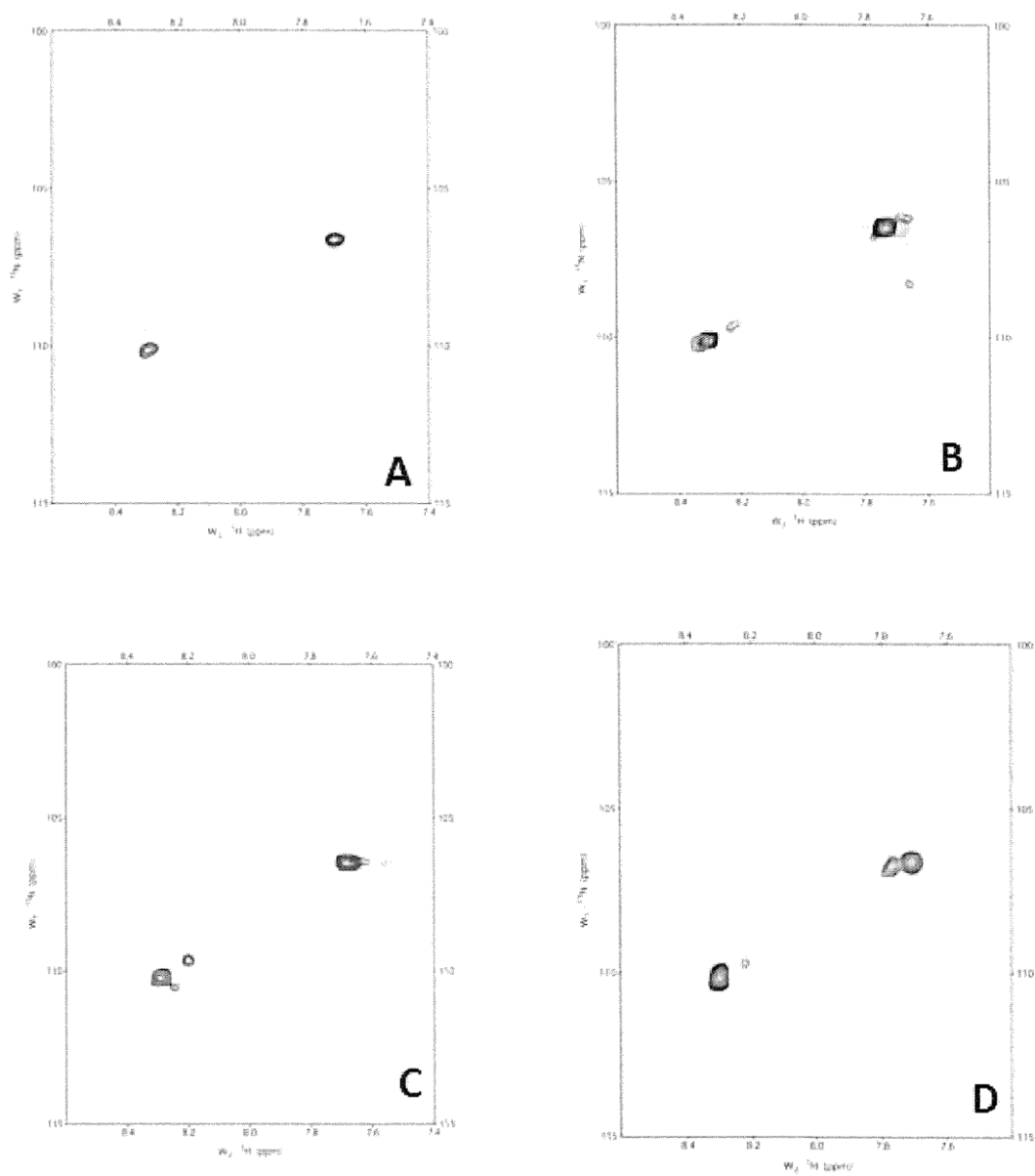


Figura 11

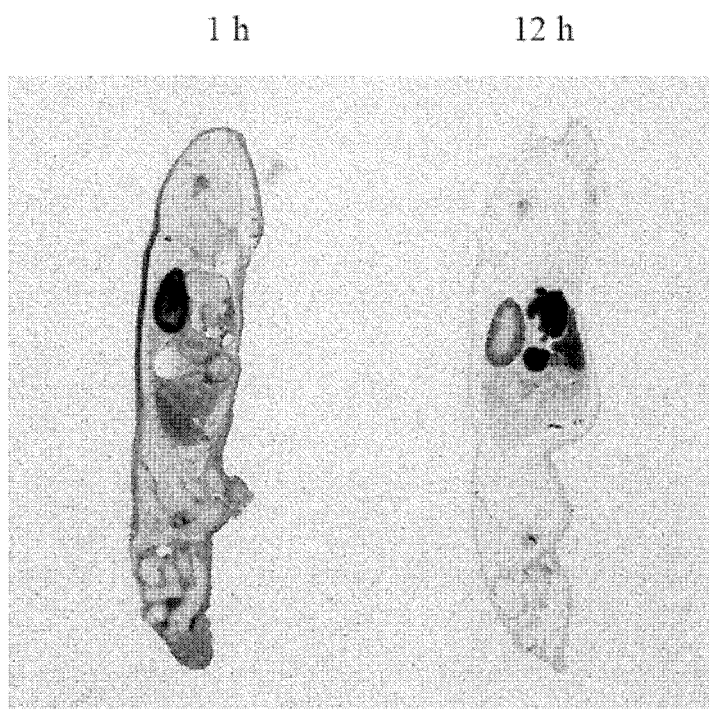


Figura 12

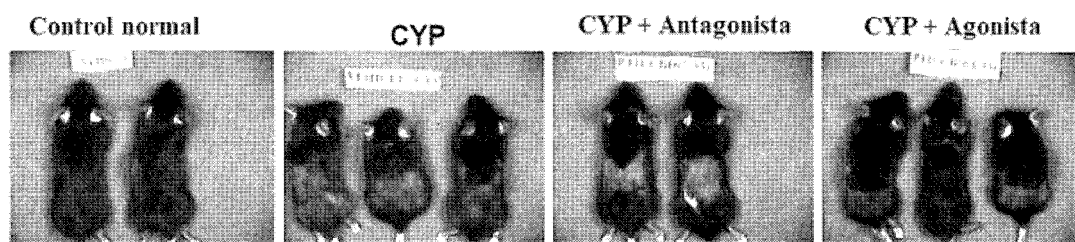
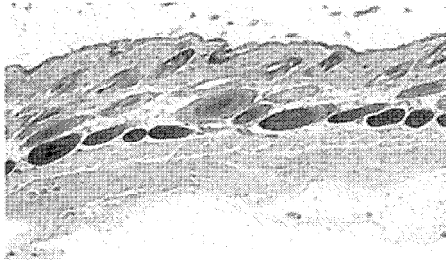
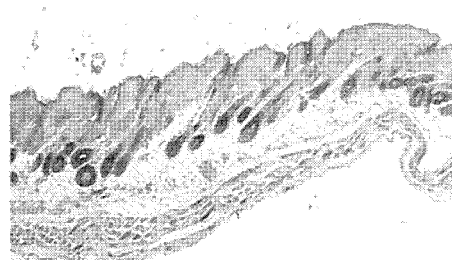


Figura 13

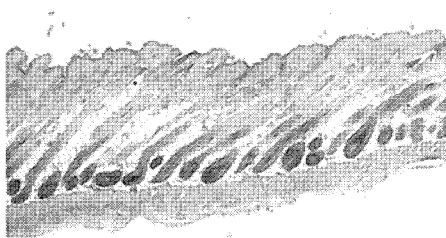
A) Control normal



B) CYP



C) CYP + Agonista



D) CYP + Antagonista

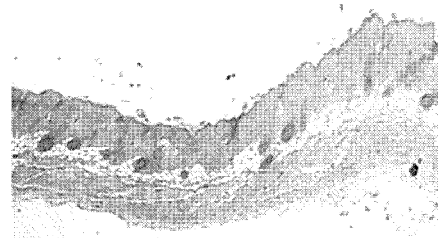


Figura 14

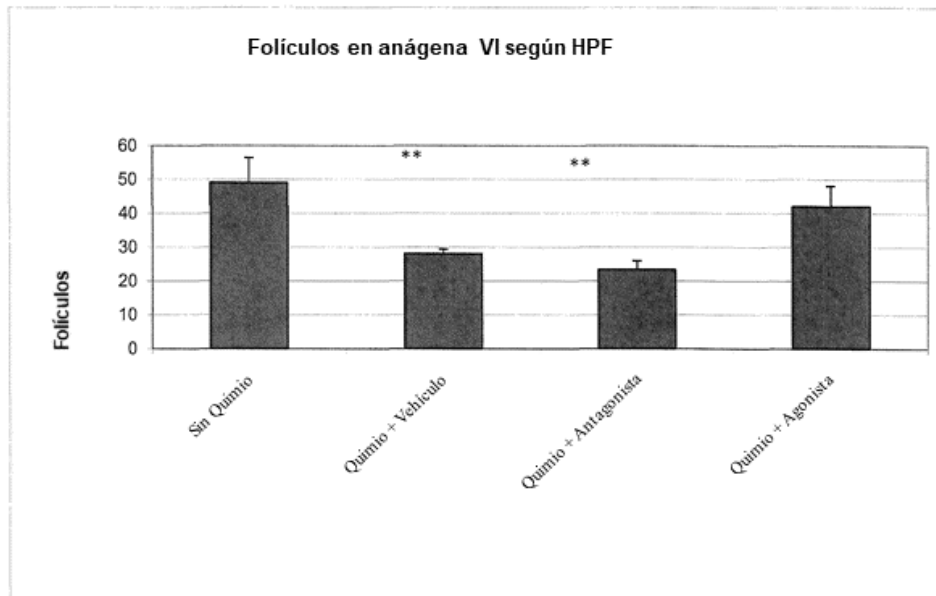
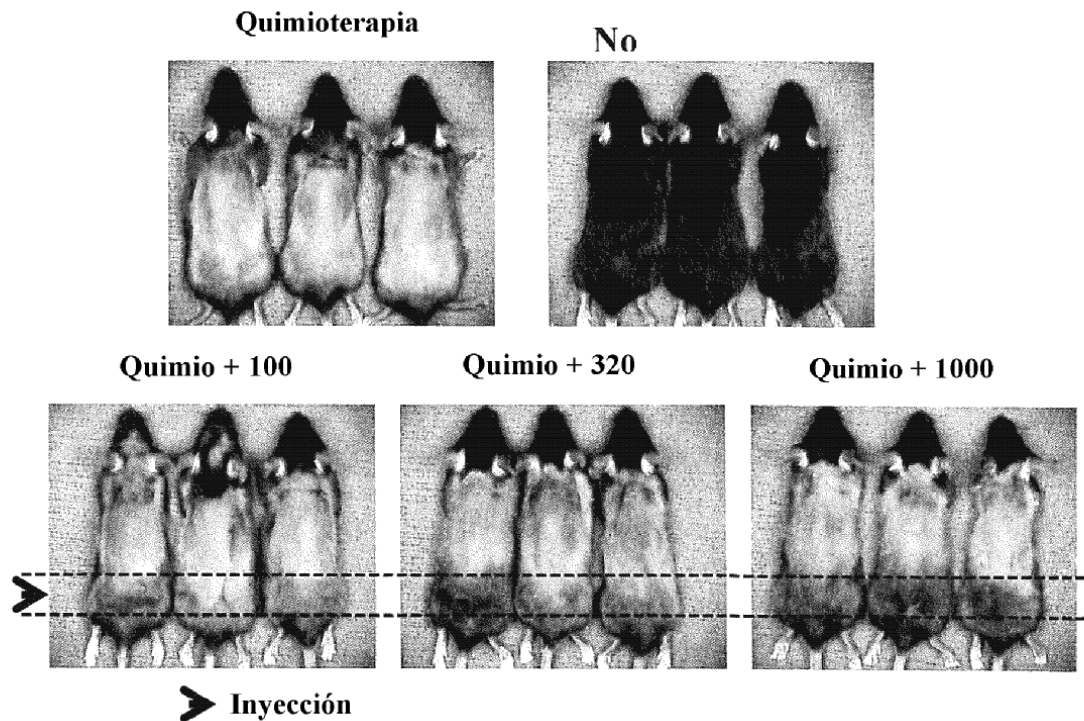


Figura 15



Análisis en escala de grises en el sitio de inyección

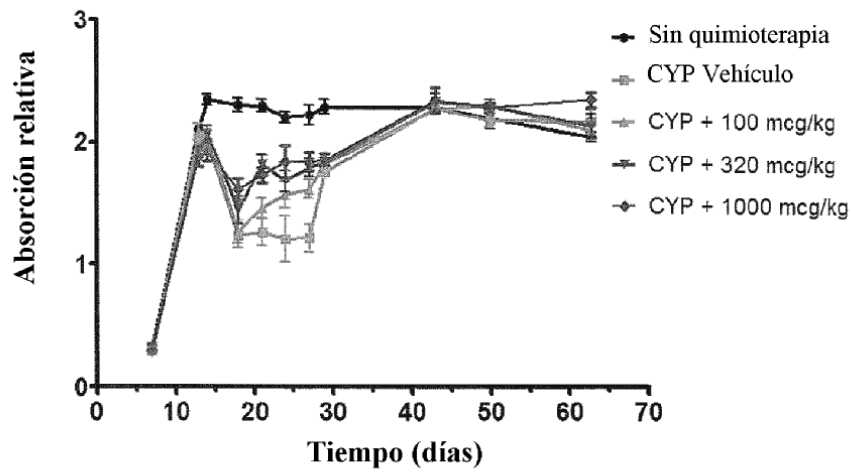


Figura 16

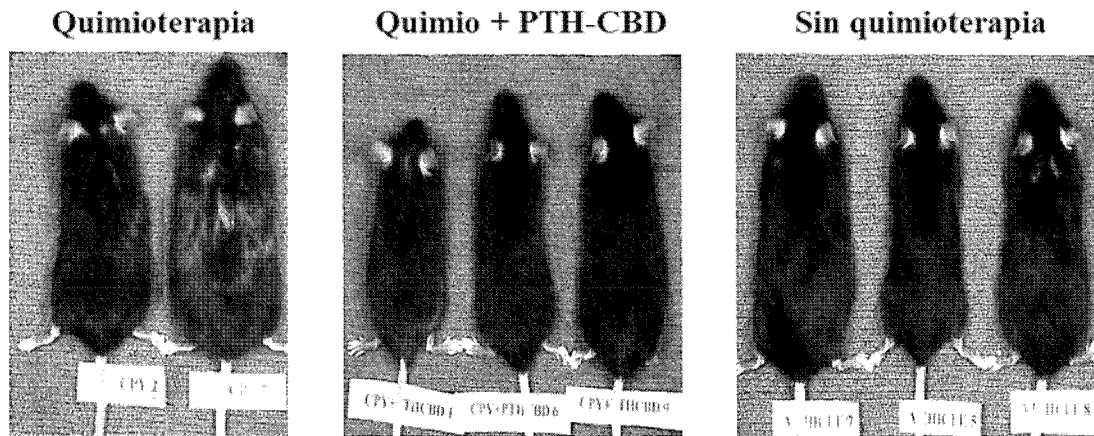


Figura 17

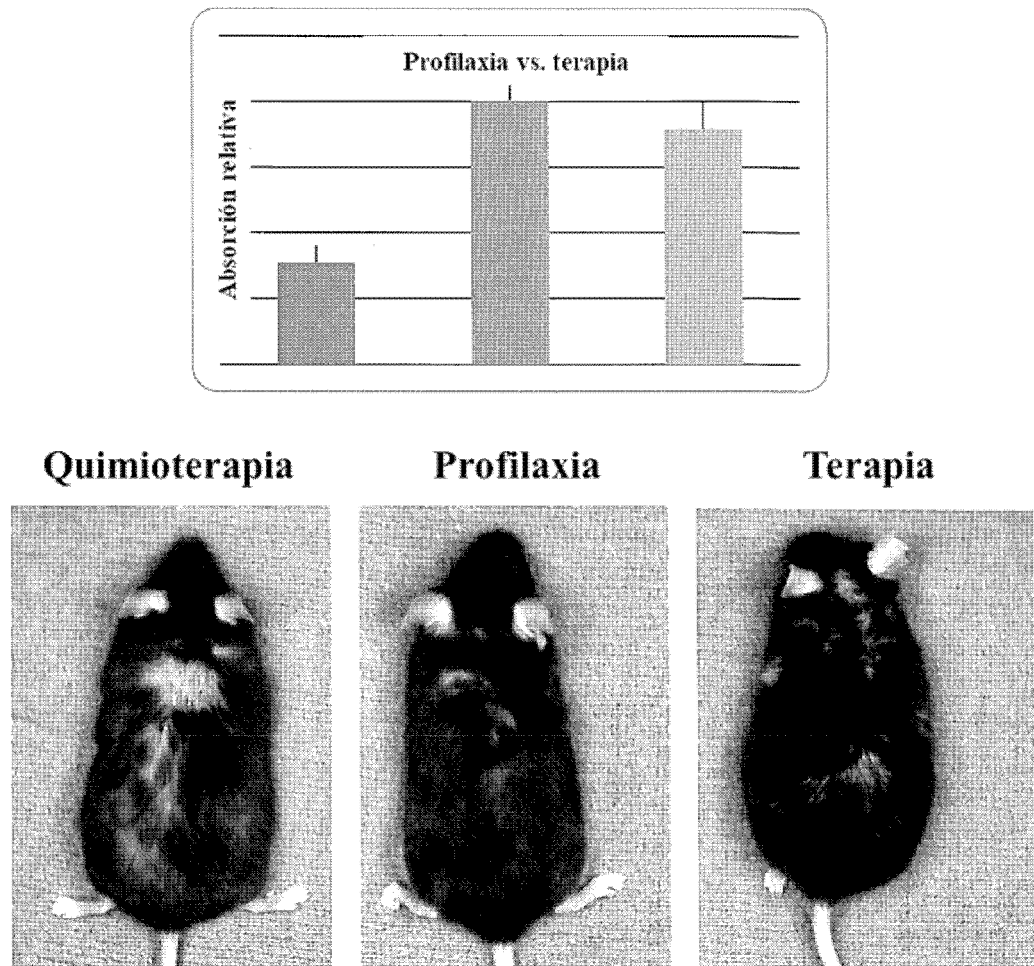


Figura 18

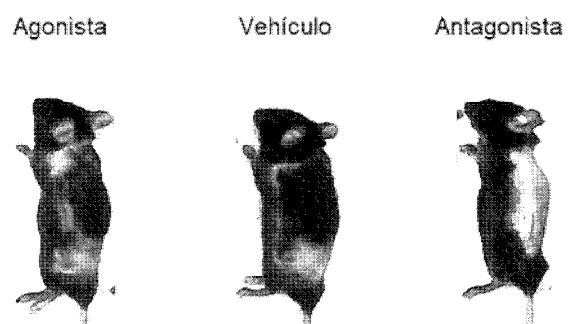


Figura 19

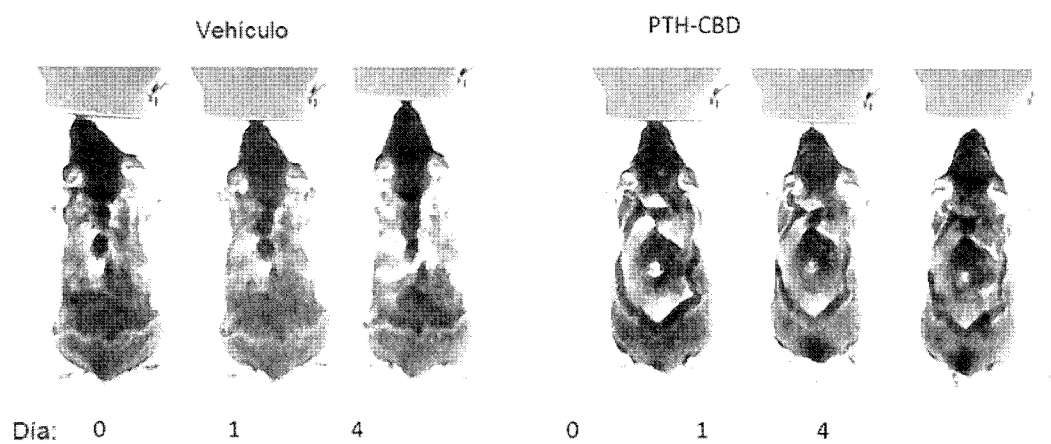


Figura 20

