



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 379**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12N 9/18** (2006.01)

**C12N 9/26** (2006.01)

**A61K 38/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **94911550 .5**

86 Fecha de presentación : **10.03.1994**

87 Número de publicación de la solicitud: **0688362**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.12.1995**

54 Título: **Clonado y producción recombinantes de enzimas de veneno de vespídeos tales como fosfolipasa y hialuronidasa, y terapias inmunológicas basadas en los mismos.**

30 Prioridad: **11.03.1993 US 31400**  
**11.01.1994 US 180209**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.08.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.08.2007**

73 Titular/es: **The Rockefeller University**  
**1230 York Avenue**  
**New York, New York 10021, US**

72 Inventor/es: **King, Te Piao**

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

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

Clonado y producción recombinantes de enzimas de veneno de vespídeos tales como fosfolipasa y hialuronidasa, y terapias inmunológicas basadas en los mismos.

La investigación que ha conducido a la presente invención ha sido apoyada por el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, mediante la subvención AI 17021. El Gobierno de los Estados Unidos puede detentar ciertos derechos sobre la invención.

**Sector técnico al que pertenece la invención**

La presente invención está dirigida a ácidos nucleicos que codifican alérgenos de veneno de vespídeos, en particular hialuronidasa del veneno, o fragmentos de los mismos, vectores recombinantes que comprenden dichos ácidos nucleicos, y células huésped que contienen los vectores recombinantes. La invención está dirigida además a la expresión de dichos ácidos nucleicos para producir una hialuronidasa de veneno de vespídeo recombinante, o fragmentos recombinantes de la misma. Este alérgeno y fragmentos del mismo son útiles para el diagnóstico de alergias y para el tratamiento terapéutico de las mismas.

**Antecedentes de la invención***Aspectos bioquímicos de los alérgenos de veneno de insectos*

La alergia a las picaduras de insectos en el caso de abejas y vespídeos es una incidencia habitual. Los vespídeos comprenden avispones, avispas con pintas amarillas y avispas comunes (Golden, y otros, 1989, Am. Med. Assoc. 262:240). Las personas susceptibles pueden verse sensibilizadas cuando se someten a la exposición de diminutas cantidades de proteínas del veneno; una reducida cantidad, del orden de 2-10  $\mu$ g de proteína, es inyectada en la piel por una sola picadura de un vespídeo (Hoffman y Jacobson, 1984, Ann. Allergy. 52:276). Hay muchas especies de avispones (género Dolichovespula), avispas con pintas amarillas (género Vespula) y avispas comunes (género Polistes) en América del Norte (Akre, y otros, 1980, "Yellowjackets of America North of Mexico", Agriculture Handbook N° 552, US Department of Agriculture). Los vespídeos tienen venenos de composiciones similares (King, y otros, 1978, Biochemistry 17:5165; King, y otros, 1983) Mol.Immunol. 20:297; King, y otros, 1984, Arch. Biochem. Biophys. 230:1; King, y otros, 1985, J. Allergy and Clin. Immunol. 75:621; King, 1987, J. Allergy Clin. Immunol. 79:113; Hoffman, 1985, J.Allergy and Clin. Immunol. 75:611). Cada uno de dichos venenos comprende tres alérgenos de veneno principales, fosfolipasa (37 kD), hialuronidasa (43kD), y antígeno 5 (23kD) de función biológica todavía desconocida.

Además de los alérgenos del veneno de insectos descritos anteriormente, la secuencia completa de aminoácidos de varios alérgenos principales de diferentes tipos de hierba (Perez, y otros, 1990, J. Biol. Chem. 265:16210; Ansari, y otros, 1989, Biochemistry 26:8665; Silvanovich, y otros, 1991, J. Biol. Chem. 266:1204), polen de árboles (Breiteneder, 1989, EMBO J. 8:1935; Valenta, y otros, 1991, Science, 253:557), polen de plantas (Rafnar, y otros, 1991, J.Biol. Chem. 266:1229; Griffith, y otros, 1991, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 96:296), ácaros (Chua, y otros, 1988, J.Exp. Med 167:175), caspa de gatos (Griffith, y otros, 1992, Gene. 113:263), y moho (Aruda, y otros, 1990, J. Exp. Med. 172:1529; Han, y otros, 1991, J. Allergy Clin. Immunol. 87:327) han sido publicados en estos últimos años. Estos alérgenos principales son proteínas de 10-40kD y tienen funciones biológicas muy distintas. Casi la totalidad de alérgenos de secuencias conocidas tienen un grado de similitud de secuencia variable con otras proteínas de nuestro medio ambiente.

*Epítomos de alérgenos de células T y B*

Las respuestas de anticuerpos a proteínas requieren la colaboración de linfocitos T helper y B, y células que presentan antígenos (APC). Los receptores antígenos de células B son las moléculas de anticuerpos unidas a membranas (Ab), que reconocen y unen inmunogénicos directamente. Los receptores antígenos de células T (TCR) solamente reconocen y unen complejos de moléculas antígenas de péptidos-MHC clase II. Los inmunogénicos son procesados, en primer lugar, por APC en péptidos que son presentados sobre la superficie de APC en asociación con las moléculas MHC clase II (Unanue, 1992, Current Opinion in Immunol 4:63). Dado que las moléculas MHC son altamente polimórficas en individuos, tienen diferente especificidad de unión de péptidos antígenicos (Rothbard y Getter, 1991, Ann.Rev. Immunol 9:527). Éste es un mecanismo para control genético de la respuesta inmune.

Las células T helper son activadas cuando el receptor antígeno une el complejo péptido-MHC sobre la superficie de APC. Las células T activadas segregan linfoquinas. En ratones (Street y Mosmann, 1991, FASEB J.5:171) y aparentemente en humanos (Wierenga, y otros, 1990, J. Immunol. 144:4651; Parronchi, y otros, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:4538), las células T helper pueden ser divididas en diferentes tipos, en base a sus modelos de producción de linfoquina. Básicamente, las células T helper se dividen en dos grupos: células TH1 que producen IL-2 y IFN- $\gamma$ , y células TH2 que producen IL-4 y IL-5. Estas linfoquinas influyen, a su vez, en las células B activadas por antígenos para diferenciar y proliferar en células de plasma que segregan Abs de diferentes isotipos. IL-4 es una linfoquina de la que se sabe que influye en la síntesis de IgE (Finkelman, y otros, Ann. Rev. Immunol. 8:303).

Se cree que la totalidad de superficie accesible de una molécula de proteína puede ser reconocida como epítomos por los receptores antígenos de células B, si bien todos los epítomos no son necesariamente reconocidos con igual probabilidad (Benjamin, y otros, 1984, Ann. Rev. Immunol. 2:67). Los epítomos de células B de una proteína son de dos tipos: topográficos y lineales. El tipo topográfico consiste en residuos de aminoácidos espacialmente adyacentes pero que pueden ser o no secuencialmente adyacentes. El tipo lineal consiste solamente en residuos adyacentes secuencialmente. Los datos cristalográficos de rayos X de complejos Ag-Ab indican la dimensión de su región de unión complementaria para tener 16-17 residuos de aminoácidos (Amit, y otros, 1986, Science 233:747), pero la determinación de péptidos sugiere que menos de unos 8 residuos contribuyen significativamente al proceso de unión de un epítomo lineal (Appel, y otros, 1990, J. Immunol. 144:976).

Los alergénicos, igual que otros antígenos de proteínas, pueden tener ambos tipos de epítomos de células B o solamente uno. Por ejemplo, los antígenos de vespídidos 5s tienen ambos tipos (King y otros, 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 91:283). El veneno de abeja melitina parece tener solamente un epítomo de célula B de tipo lineal (King y otros, 1984, J. Immunol. 133:2668).

Los epítomos de células T de proteínas consisten solamente en el tipo lineal, dado que son péptidos que han sido procesados en los lisosomas de APC por proteasas de especificidades conocidas (Unanue, 1992, Curr. Op. Immunol. 4:63). El análisis de péptidos antigénicos procesados de forma natural, unidos a moléculas MHC de clase II, indican que su dimensión está comprendida entre 13 y 17 residuos de aminoácidos aproximadamente, pero el análisis de complejo de péptido sintético-molécula MHC clase II, en cuanto su respuesta de proliferación de células T, sugiere una dimensión mínima de unos 8 residuos de aminoácidos aproximadamente (Cf. Rudensky y otros, 1991, Nature 353:622). Ciertos estudios sugieren que los epítomos de células T están distribuidos en la totalidad de la molécula de la proteína, y que pueden funcionar como determinantes principales o menores dependiendo del haplotipo de MHC del huésped inmunizado (Roy, y otros, Science 244:572; Gammon, y otros, 1987, Immunol. Rev. 98:53; O'Hehir y otros, 1991, Ann. Rev. Immunol. 9:67).

La hipersensibilidad del tipo inmediato es sabido que es provocada por la presencia de IgE específico de alergénico. El IgE se encuentra en la circulación y unido a receptores específicos IgE-FC en mastocitos y basófilos. La reticulación de IgE unido a células por alergénicos conduce a la liberación de histamina, leucotrienos y otros mediadores químicos que provocan los síntomas alérgicos. El IgE es uno de los diferentes isotipos de las inmunoglobulinas. Tal como se ha indicado anteriormente, las linfoquinas segregadas por células T influyen eventos de cambio de isotipos en células B.

Debido al papel central de las células TH2 en la determinación del evento de cambio de isotipos de las células B, los epítomos de células T de varios alergénicos han sido determinados (Cf. O'Hehir y otros, *ver anterior*). Estos alergénicos incluyen Amb a III de plantas "ragweed", *Lol p I* de plantas "rye grass", *Fel d I* de gato, orina de ratón *Mus m I*, *Chi t 1* de "midge", fosfolipasa A<sub>2</sub> de veneno de abeja (Dhillon, y otros, 1992, J. Allergy Clin. Immunol. 90:42), melitina (Fehlner, y otros, 1991, J. Immunol. 196:799) y antígeno 5 de avispon (King y otros, 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 91:283). Los datos no revelan ninguna característica estructural inhabitual o común. No obstante, no se puede sacar ninguna conclusión de estos datos dado que han sido recogidos de humanos y ratones de diferentes haplotipos.

#### *Modulación de las respuestas de células T y B*

Normalmente, los hospedantes son tolerantes a los epítomos dominantes de células B y T de autoproteínas por delección clonal y anergia. No obstante, esta tolerancia puede ser interrumpida en ciertas circunstancias (Gammon, y otros, 1991, Immunol. Hoy. 12:193; Basten, y otros, 1991, Immunol. Rev. 122:5). Se ha sugerido que la autotolerancia es interrumpida en enfermedades autoinmunes por encuentros con proteínas extrañas que son similares a las proteínas del hospedante. Por lo tanto, la similitud de secuencia de alergénicos con proteínas autólogas es de interés para una investigación más profunda.

Las células B maduras son activadas como respuesta a antígenos multivalentes que pueden reticular receptores Ig de la superficie celular (DeFranco, 1987, Ann. Rev. Cell Biol. 3:143), y se hacen anérgicas como respuesta a un antígeno monovalente (Basten, y otros, 1991, *ver anterior*). La activación de antígeno de células T requiere no solamente la integración de TCR con complejo péptido-MHC sino también con otras señales coestimulantes en la superficie de APC (Schwartz, 1990, Science 248:1349; Jenkins y Miller, 1992, FASEB J 6:2428). La interacción de TCR con complejo péptido-MHC en ausencia de señales coestimulantes puede conducir a anergia a células T.

El mecanismo molecular de la anergia de células B ó T no está todavía bien comprendido (Cf. Schwartz, 1990, *ver anterior*; Jenkins y Miller, 1992, *ver anterior*; Ales-Martínez, y otros, 1991, Immunol. Hoy 12:201). En estudios *in vitro* con clones de células T se ha revelado que la ocupación de TCR por complejo de péptido artificial-MHC en ausencia de señales coestimuladoras conduce a una transducción de señal intracelular alterada y/o activación de gen represor que puede impedir la transcripción de linfoquina.

Primeros estudios han mostrado que el estado físico del inmunógeno y la ruta de inmunización son importantes variables en la determinación del resultado de una respuesta inmune. A la luz de los conocimientos actuales, estas variables es posible que influyan en la presentación del antígeno a efectos de tener activación de células T y B o anergia.

Una forma de tratar enfermedades alérgicas es por inmunoterapia que comporta inyecciones subcutáneas repetidas de los alérgenos atacantes en los pacientes. Las cantidades de alérgenos que se pueden inyectar están limitadas por el peligro de reacción alérgica sistémica no deseada en los pacientes. Para la mayor parte de pacientes que siguen la inmunoterapia, sus niveles de IgE específicos de alérgenos aumentan inicialmente, seguido de una disminución gradual de sus niveles de IgE específicos de alérgenos, existiendo también una regulación descendente de respuestas de células T específicas de alérgenos (P.S. Norman, 1993, *Current Op. Immunol.* 5:968).

Dada la reacción sistémica no deseable en la inmunoterapia con alérgenos nativos, ha existido un interés continuado en el desarrollo de alérgenos modificados con actividades alérgicas reducidas para inmunoterapia (T.P. King, 1993, en "Bronchial Asthma", editado por E.B. Weiss y M. Stein, Little Brown, Boston, págs. 43-49; R.E. O'Hehir y otros, 1991, ver anterior).

Han aparecido recientemente dos informes de la utilización de péptidos de epítipo de células T para modular las respuestas inmunes específicas de alérgenos. Un informe se refiere a la inyección subcutánea de ratones con dos péptidos procedentes del alérgeno principal de gato Fel d I, disminuyendo la respuesta de células T a la molécula completa Fel d I (Briner y otros, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:7608-12). Otro se refiere la terapia intranasal con un péptido de un alérgeno principal de ácaro Der p I para suprimir respuesta específica de alérgeno en ratones en estado natural o sensibilizados (Hoyne y otros, 1993, *J. Exp. Med.* 178:1783-1788).

Dado que una molécula de clase II MHC de cualquier haplotipo puede unir una amplia gama de péptidos en su ranura de unión, puede ser posible modular la respuesta de células T por inhibición de epítipo de célula T derivado de alérgeno, uniendo a moléculas MHC con otros péptidos. Por ejemplo, un péptido de lisocima de ratón, que no es inmunogénico en sí mismo en ratones H-2<sup>k</sup>, inhibe la respuesta de células T a la lisocima de la clara de huevo de gallina (Adorini y Nagy, 1990, *Immunol. Hoy.* 11:21). Otro ejemplo es la inhibición *in vitro* de la respuesta de células T a un alérgeno de ácaro por un péptido HA de gripe (O'Hehir y otros, 1991, *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:1120).

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en ratones o ratas es un modelo bien estudiado para la esclerosis múltiple. Muchos estudios han identificado los determinantes de células T inmunodominantes para proteína básica de mielina, que se utiliza para inducir este estado. Los péptidos que corresponden a epítopos inmunodominantes de proteína básica de mielina pueden inducir tolerancia al mismo antígeno de péptido o a la proteína básica de mielina intacta. Los mismos péptidos que han inducido tolerancia podrían inducir también anergia a células T en una respuesta autoinmune actual (Gaur y otros, 1992, *Science* 259:1491-1994).

La respuesta inmune a un inmunógeno/alérgeno depende en parte de la constitución genética del hospedante, de la ruta y forma de la inmunización y del inmunógeno/alérgeno. La extensión a la que un alérgeno de veneno de víspido determina el resultado de la respuesta IgE no es conocida. ¿Cuántos epítopos de células B y T tiene cada alérgeno de veneno de víspido? ¿Existen epítopos de células B o T inmunodominantes de un alérgeno de veneno de víspido reconocidos por diferentes individuos o por todos los individuos susceptibles? ¿Existen epítopos de células T que favorecen eventos de cambio de clase IgE en células B? ¿Juega algún papel la reactividad cruzada antigénica de alérgenos de veneno de víspido con proteínas hospedantes en cuanto a la razón por la que algunas proteínas son más alérgicas que otras? ¿Se puede inducir tolerancia a un alérgeno de veneno de víspido multivalente por tratamiento con un epítipo único de células B o T o una combinación de los mismos?.

Por lo tanto, existe la necesidad en esta técnica de delimitar los epítopos de células B y helper T de alérgenos principales de veneno de víspidos. Existe, en especial, la necesidad de delimitar los epítopos de células B y helper T de los víspidos de clase avispon ("hornet") (por ejemplo, *Dolichovespula arenaria*), avispas con pintas amarillas ("yellowjacket") (por ejemplo, *Vespula vulgaris*) y avispas comunes (por ejemplo, *Polistes annularis*). En particular, los alérgenos principales de veneno de víspido fosfolipasa y hialuronidasa son objetivos apropiados para determinar los epítopos importantes de células B y T. A efectos de enfocar por completo la base para la respuesta alérgica a los alérgenos de víspidos, y para desarrollar inmunoterapias basadas en alérgenos, se deben investigar los DNAC y secuencias de proteínas de varios alérgenos homólogos. Además, se deben desarrollar vectores adecuados para expresión de alto nivel en bacterias y células eucarióticas de alérgenos de víspidos o sus fragmentos. Entonces, los alérgenos de víspidos recombinantes y sus fragmentos pueden ser utilizados para definir sus epítopos de la banda de células T en murinos y, más importante, sistemas humanos por pruebas de unión de anticuerpos y proliferación de células T, respectivamente.

Existe además la necesidad de determinar si existe reacción cruzada de los epítopos de células T y B de alérgenos de víspidos con otras proteínas del medio ambiente y/o autólogas. Por lo tanto, existe la necesidad de determinar si los alérgenos de víspidos comparten identidad parcial con otras proteínas del medio ambiente, especialmente con proteínas autólogas y, de manera más importante, para obtener las secuencias de las regiones de la identidad parcial, en particular las secuencias específicas de aminoácidos de dichas regiones de identidad parcial. Existe además la necesidad de determinar el nivel de reactividad cruzada de alérgenos de víspidos con otras proteínas en el nivel de células B y T, la relevancia de esta reactividad cruzada, y si dicha reactividad cruzada es patológica, es decir, está involucrada en alergia o responsable de la misma, o es beneficiosa, es decir, inhibitoria de la alergia.

Existe también la necesidad en esta técnica de utilizar péptidos que tengan epítopos de células B o T de alérgenos de veneno de víspidos para estudiar la inducción de tolerancia en ratones y la inducción de tolerancia en humanos.

Existe además la necesidad de probar si un péptido modificado inhibe epítipo alérgeno de células T, uniéndose a la molécula MHC de clase II, o induce anergia de células T, o ambos.

Por lo tanto, existe la necesidad en esta técnica de información de secuencia de alérgenos de veneno de víspidos, y una fuente abundante de dichos alérgenos para investigaciones inmunológicas y para terapia inmunológica de la alergia.

Las citas de referencias no se considerarán como admisión de que son anterioridades con respecto a la presente invención.

### Características de la invención

La presente invención da a conocer ácidos nucleicos que codifican hialuronidasas de veneno de víspidos, y fragmentos inmunomodulatorios, derivados o análogos de los mismos. En particular, la invención está dirigida a ácidos nucleicos que codifican hialuronidasa de veneno de víspido, por ejemplo, hialuronidasa *D. maculata*. En realizaciones específicas, un ácido nucleico según la invención codifica una parte inmunomodulatoria de un epítipo de células T de una hialuronidasa de veneno de víspido. En otra realización específica, un ácido nucleico según la invención codifica una parte antigénica de un epítipo de células B de una hialuronidasa de veneno de víspido. La expresión de los ácidos nucleicos de la invención proporciona una fuente abundante de enzimas de víspidos para diagnóstico y terapia.

Es una ventaja especial de la presente invención el dar a conocer secuencias de ácido nucleico que codifican una serie de hialuronidasas de veneno de víspidos. Estas secuencias de ácidos nucleicos permiten la deducción de una secuencia de aminoácido de las enzimas de veneno de víspidos. El conocimiento de la secuencia de aminoácido permite la determinación de epítopos relevantes de células T y células B de un encima. De modo más importante, los epítopos inmunodominantes de células T y células B pueden ser determinados para cada individuo sensible al alérgeno de la encima o grupo de individuos, es decir, aquellos que comparten un haplotipo MHC susceptible, o para los que el epítipo de células T favorece sucesos de cambio de clase a anticuerpos de clase IgE. Una vez que dichos epítopos de células T y células B han sido determinados, es posible diseñar terapias inmunológicas para estados alérgicos específicos de enzimas de veneno de víspidos, por ejemplo, en cuanto a sensibilidad a la hialuronidasa de veneno de víspidos.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer además polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos de la invención. En particular, la invención da a conocer polipéptidos que tienen una parte inmunomodulatoria de un epítipo de células T de la hialuronidasa de veneno de víspidos. En otra realización, la invención da a conocer polipéptidos que tienen una parte antigénica de un epítipo de células B de la hialuronidasa de veneno de víspidos. Más particularmente, la invención da a conocer estos polipéptidos de una hialuronidasa de veneno de víspido, por ejemplo, hialuronidasa *D. maculata*.

La presente invención da a conocer además vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos de la invención, asociados operativamente con un promotor. La presente invención también da a conocer métodos para la producción de las hialuronidasas de veneno de víspidos, codificadas por los ácidos nucleicos de la invención. En particular, la invención da a conocer el cultivo de una célula transformada con un vector de expresión de la invención, de manera que la hialuronidasa de veneno de víspido es expresada por la célula, y recuperando la encima del veneno de víspido expresada, de este modo, del cultivo. Más particularmente, la invención da a conocer la expresión de vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican una hialuronidasa de veneno de víspidos, por ejemplo, hialuronidasa *D. maculata*, o fragmentos, derivados o análogos de los mismos.

En otra realización adicional, la presente invención da a conocer un compuesto farmacéutico efectivo para el tratamiento de un estado alérgico específico de alérgenos de veneno de víspidos, comprendiendo un polipéptido según la invención que tiene una parte inmunomodulatoria de un epítipo de célula T de una hialuronidasa de veneno de víspido, o una parte antigénica de un epítipo de célula B de una hialuronidasa de veneno de víspido. Mas particularmente, la invención da a conocer compuestos farmacéuticos que comprenden estos polipéptidos de una hialuronidasa de veneno de víspido, por ejemplo, hialuronidasa *D. maculata*.

En otra realización adicional, la presente invención da a conocer un método para el tratamiento de un estado específico de alérgeno de veneno de víspido, comprendiendo la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de un compuesto farmacéutico según la invención.

Por lo tanto, una ventaja de la invención es que da a conocer la producción de muchas hialuronidasas de veneno de víspidos, que se pueden utilizar terapéuticamente para el tratamiento de estados alérgicos específicos de enzimas de veneno de víspidos. De modo más importante, el tratamiento terapéutico puede ser muy específico e individualizado, puesto que la invención permite la producción de un polipéptido de encima de veneno de víspido que tiene actividad inmunomoduladora en cualquier individuo o grupo de individuos.

Otra ventaja específica de la presente invención consiste en tener las secuencias de ácidos nucleicos y las secuencias de aminoácidos deducidas de un gran volumen de diferentes hialuronidasas de veneno de víspidos, de diferentes especies de víspidos permitiendo comparación de la homología de enzimas análogas entre especies. Esta información proporciona una base para evaluar la reactividad cruzada de los alérgenos, que puede ser importante para reacciones alérgicas y para tratamientos terapéuticos.

Otra ventaja de la presente invención es que puede ser evaluado el grado de similitud de muchas hialuronidasas de veneno de vespídeos con respecto a proteínas del medio ambiente y/o proteínas autólogas. Se cree que la similitud de las encimas de veneno de vespídeos con respecto a dichas proteínas del medio ambiente, y particularmente con respecto a proteínas autólogas, tiene importantes aplicaciones para la respuesta alérgica.

## Abreviaturas

Dol m Avispón de cara blanca ("white face hornet") *dolichovespula maculata*

Dol a Avispón amarillo ("yellow hornet") *D. arenaria*

Pol a Avispa *Polistes annularis*

Pol e avispa *P. exclamans*.

Ves m Avispón con pintas amarillas ("yellowjacket") *vespula maculifrons*

Ves v Avispón con pintas amarillas ("yellowjacket") *V. vulgaris*

PCR reacción en cadena de polimerasa

RACE amplificación rápida de los extremos de DNAC

TCR T para antígeno receptor de células

## Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Secuencias de DNAC (SEQ ID NO:54) y aminoácido (SEQ ID NO:55) de hialurodidasa de avispa (Dol m II). Las posiciones de nucleótidos y aminoácidos están numeradas a la derecha. La numeración de los residuos de los aminoácidos empieza y termina en los residuos terminales N y C serina y asparragina, respectivamente, correspondientes a posiciones de nucleótidos de 61-63 y 1051-1053, respectivamente. La secuencia de aminoácido subrayada fue también establecida por degradación de Edman.

Figura 2. Comparación de secuencias de hialuronidasas de abeja de miel (SEQ ID NO:56) y veneno de avispón (SEQ ID NO:57) y proteína de esperma de cobaya PH-20 (SEQ ID NO:58). La alineación empieza con residuo 1 tanto para hialuronidasas como residuo 4 para PH-20. La hialuronidasa de veneno de abeja y PH-20 contienen residuos 349 y 495, respectivamente. Los intersticios, indicados por acentos, se añadieron para hacer máxima la homología de la secuencia. Los círculos llenos destacan los residuos de aminoácidos que son comunes a estas proteínas.

Figura 3. Ensayo de proliferación con células primarias de bazo después de dos inmunizaciones con hialuronidasa de (A) veneno de avispón de cara blanca y (B) veneno de abejas. Las células de bazo fueron obtenidas diez días después de dos inmunizaciones i.p. con 10 mg/ml de hialuronidasa de veneno en 5 mg/ml alum, con un intervalo de dos semanas entre sí. Los bazos fueron retirados y se estimularon los leucocitos ( $4-5 \times 10^{-6}$  células/ml) *in vitro* con hialuronidasa (O) de veneno de avispón de cara blanca o hialuronidasa de veneno de abeja (A) a las concentraciones indicadas en placas de cultivo de 96 pocillos. El volumen final de cada cultivo era de 200 ml. Se llevaron a cabo ensayos de proliferación en medio suplementario 10R con antibiótico y suero fetal bovino. Después de tres días de incubación, se añadieron 0,5-1  $\mu$ Ci de  $^3$ H-timidina a cada cultivo, y las células fueron recogidas 20 horas más tarde. Las incorporaciones de fondo de  $^3$ H-Thy fueron de  $7320 \pm 9\%$  cpm para (A) y  $8500 \pm 15\%$  cpm para (B).

Figura 4. Ensayo de proliferación con células primarias de bazo después de cinco inmunizaciones con hialuronidasa de veneno de avispón de cara blanca (A) y hialuronidasa de veneno de abeja (B). Las menciones de las figuras corresponden a la figura 3, y las inmunizaciones fueron llevadas a cabo tal como se describe en la figura 3 con una separación de 2 semanas entre sí. El ensayo de proliferación fue llevado a cabo también tal como se ha descrito en la figura 3. Se debe observar que la magnitud de las respuestas había incrementado aproximadamente dos veces en comparación con los ratones inmunizados dos veces, si bien los valores en blanco siguieron siendo aproximadamente los mismos. La incorporación de fondo de  $^3$ H-Thy fue de  $11187 \pm 4\%$  cpm para (A) y  $6084 \pm 26\%$  cpm para (B).

## Descripción detallada de la invención

La presente invención está dirigida a ácidos nucleicos recombinantes que codifican hialuronidasas de veneno de vespídeos, y a fragmentos inmunomodulatorios, derivados o análogos de los mismos, y polipéptidos codificados por dichos ácidos nucleicos útiles en el diagnóstico y terapia de alergias específicas de veneno de vespídeos. En realizaciones específicas, la presente invención está dirigida a ácido nucleico recombinante que codifica un fragmento inmunomodulatorio de una hialuronidasa de veneno de vespídeo, en particular hialuronidasa *D. maculata*.

La invención está dirigida además a vectores de expresión que comprenden estos ácidos nucleicos, y a métodos para la producción de polipéptidos de encima de veneno de vespido según la invención, expresando dichos vectores de expresión y recuperando los polipéptidos de encima de veneno de vespido expresados.

5 La invención da a conocer también compuestos farmacéuticos eficaces para el tratamiento de un estado alérgico específico de alérgenos de veneno de vespidos, comprendiendo un polipéptido según la invención, y métodos para el tratamiento de dichos estados alérgicos, comprendiendo la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de los compuestos farmacéuticos de la invención.

10 Los polipéptidos de la invención pueden ser también útiles para diagnóstico de estados alérgicos específicos de veneno de vespidos.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “alérgeno de veneno de vespidos” se refiere a una proteína que se encuentra en el veneno de un vespido, a la que las personas susceptibles se sensibilizan al quedar expuestas a la  
15 picadura del insecto. Si bien la mayor parte de antígenos se caracterizan por ser reactivos con anticuerpos de clase IgG específicos, un alérgeno se caracteriza por ser reactivo también con anticuerpos de tipo IgE. Los anticuerpos de tipo IgE son responsables de la mediación de los síntomas de un estado alérgico, es decir, hipersensibilidad de tipo inmediato.

20 En esta descripción, el término “vespido” es utilizado de acuerdo con la práctica del sector de alergia, y se refiere a insectos que pertenecen a la familia mundial de los vespidos, es decir, avispas comunes incluyendo avispones, avispas con pintas amarillas y avispas (“paper wasps”). En particular, los vespidos incluyen las subfamilias Vespinae y Polistinae. Más particularmente, los vespidos incluyen los géneros *Vespa Linnaeus*, *Vespula Thomson*, *Dolichovespula Rohwer* y *Polistes Latreille*. Las especies del género *Vespula* incluyen, sin que ello sirva de limitación, *V. germanica* (Fab.), *V. Squamosa* (Drury), *V. Maculifrons* (Buysson), *V. Flavopilosa* (Jacobson), *V. vulgaris* (L.) Y *V. pensylvanica* (Saussure). Las especies del género *Polistes* incluyen, sin que ello sirva de limitación, *P. annularis* (Linnaeus), *P. Exclamans* (Viereck), *P. Metricus* (Say), *P. fuscatus* (Fabricius), y *P. apachus* (Saussure). Las especies del género *Dolichovespula* incluyen, sin que ello sirva de limitación, *D. maculata* (L.) Y *D. arenaria* (Fab.). Las especies del género *Vespa* incluyen, sin que ello sirva de limitación, *V. crabro* (L.) Y *V. orientalis* (Linnaeus).  
30

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “fosfolipasa” se refiere a la clase de enzimas que actúan sobre sustratos fosfolípidos, por ejemplo, para hidrolizar ácidos grasos. En una realización específica, una fosfolipasa cataliza la hidrólisis rápida del grupo acilo en la posición 1 de las fosfatidilcolinas sintéticas, y una hidrólisis lenta del grupo acilo, en la posición 2. De este modo, las fosfolipasas de vespidos de la invención pueden tener ambos tipos de  
35 actividades fosfolipasa A y B. Las fosfolipasas de la invención pueden tener también actividad de lipasa de nivel bajo.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “hialuronidasa” se refiere a la clase de enzimas que actúan sobre la unidad disacárida del ácido-D-glucorónico y N-acetil-D-glucosamina. Estas enzimas efectúan la mediación de la hidrólisis de polímeros de disacáridos repetitivos comprendiendo ácido D-glucorónico y N-acetilD-glucosamina. Un  
40 ejemplo de estos polímeros es el ácido hialurónico. La hialuronidasa cataliza la liberación de grupos reductores de 14-acetilglucosamina del ácido hialurónico.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “inmunomodulatorio” se refiere a la capacidad de incrementar o disminuir la respuesta inmune específica de un antígeno, a nivel de células B o células T. La actividad inmunomodulatoria puede ser detectada, por ejemplo, en ensayos de proliferación de células T, por medición de producción de anticuerpos, producción de linfoquina o respuesta de células T. En particular, además de afectar las respuestas de células T, los polipéptidos inmunomoduladores de la invención pueden unirse a moléculas de inmunoglobulina (es decir, anticuerpos) en la superficie de las células B y afectan también a las sensibilidades o respuestas de las  
50 células B.

Una “molécula de ácido nucleico” se refiere a la forma de polímero fosfato de éster de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina, “moléculas RNA”) o deoxiribonucleósidos (deoxiadenosina, deoxiguanosina, deoxitimidina o deoxicitidina; “moléculas ADN”) en forma de cadena única o de hélice de cadena doble. Son posibles hélices de doble cadena de ADN-ADN, ADN-RNA y RNA-RNA. El término molécula de ácido nucleico y,  
55 en particular, molécula de ADN o RNA se refiere solamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no la limita en ninguna forma terciaria específica. Por lo tanto, este término incluye ADN de doble cadena que se encuentra, entre otros, en moléculas de ADN lineales o circulares (por ejemplo, fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. En la explicación de la estructura de moléculas específicas de ADN de doble cadena, las secuencias pueden ser descritas de acuerdo con la convención normal de dar solamente la secuencia en la dirección 5’ a 3’ a lo largo de la cadena no transcrita de ADN (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga con respecto al mRNA). Una “molécula ADN recombinante” es una molécula ADN que ha sufrido una manipulación biológica molecular.

Una molécula de ácido nucleico es “hibridizable” a otra molécula de ácido nucleico, tal como DNAC, ADN genómico o RNA, cuando una forma de cadena única de la molécula de ácido nucleico puede reasociarse con otra molécula de ácido nucleico en las condiciones apropiadas de temperatura y concentración de la solución iónica (ver Sambrook y otros, 1989, más adelante). Las condiciones de temperatura y de concentración iónica determinan la “restricción” de la hibridación. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, si bien,  
65

dependiendo de la restricción de la hibridación, son posibles desajustes entre las bases. La restricción apropiada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementariedad, que son variables bien conocidas en esta técnica.

Una “secuencia de codificación” de ADN es una secuencia de doble cadena de ADN que es transcrita y traducida en un polipéptido *in vivo* cuando es puesta bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia de codificación son determinados por un codón inicial en el término 5’ (amino) y un codón de detención de traducción en el término 3’ (carboxilo). Una secuencia de codificación puede incluir, sin que ello sirva de limitación, secuencias procarióticas, DNAs procedentes de mRNA eucariótico, secuencias de ADN genómico procedente de ADN eucariótico (por ejemplo, mamíferos) e incluso secuencias de ADN sintético. Si la secuencia de codificación está destinada a expresión en una célula eucariótica, una señal de poliadenilación y secuencia de terminación de transcripción quedarán situadas habitualmente en 3’ con respecto a la secuencia de codificación.

Las secuencias de control de transcripción y de traducción son secuencias regulatorias de ADN, tales como promotores, multiplicadores, terminadores y similares, que proporcionan la expresión en la secuencia de codificación en una célula hospedante. En células eucarióticas, las señales de poliadenilación son secuencias de control.

Una “secuencia promotora” es una región reguladora de ADN capaz de unir polimerasa de RNA en una célula e iniciar transcripción de una secuencia de codificación descendente (dirección 3’). A los efectos de definir la presente invención, la secuencia promotora está unida en su término 3’ por un lugar de inicio de transcripción y se extiende hacia arriba (dirección 5’), incluyendo el mínimo número de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables encima del fondo. Dentro de la secuencia promotora, se encontrará un lugar inicio de transcripción (definido convenientemente por ejemplo, definiendo con nucleasa S1), así como dominios de unión de proteína (secuencias de consenso) responsables de la unión de polimerasa de RNA. Los promotores eucarióticos contendrán frecuentemente, pero no siempre, cajas “TATA” y cajas “CAT”.

Una secuencia de codificación está “bajo el control” de secuencias de control de transcripción y de traducción en una célula cuando la polimerasa de RNA transcribe la secuencia de codificación en mRNA, que a continuación es traducida en la proteína codificada por la secuencia de codificación.

Un “secuencia de señal” puede ser incluida antes de la secuencia de codificación. Esta secuencia codifica un péptido de señal, N-terminal con respecto al polipéptido, que dirige la célula hospedante para transportar el polipéptido a la superficie de la célula o segregar el polipéptido en el medio, y este péptido de señal es degradado usualmente de forma selectiva por la célula en la exportación. Las secuencias de señal pueden encontrarse asociadas con una serie de proteínas originales de procariotes y eucariotes.

De acuerdo con la presente invención, se pueden utilizar técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y de ADN recombinante dentro de los conocimientos de esta técnica. Estas técnicas son explicadas de manera completa en la literatura especializada. Ver, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (“Clonado Molecular: Manual de laboratorio”), Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (“Sambrook y otros, 1989”); “ADN Cloning: a Practical Approach” (“Clonado ADN: Enfoque Práctico”), Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); “Oligonucleotide Synthesis.” (“Síntesis de Oligonucleótidos”) (M.J. Gait ed. 1984); “Nucleic Acid Hybridization” (“Hibridación de ácidos nucleicos”), [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; “Transcription And Translation” (“Transcripción y Traducción”) [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds (1984)]; “Animal Cell Culture” (“Cultivo de Células Animales”) [R.I. Freshney, ed. (1986)]; “Immobilized Cells And Enzymes” (“Células y Enzimas Inmovilizadas”) [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, “A Practical Guide To Molecular Cloning” (“Guía Práctica al Clonado Molecular”) (1984).

La presente invención se basa, en parte, en el clonado y determinación de secuencia de hialuronidasas de veneno de víspidos. El clonado y determinación de secuencia de estas enzimas de veneno de víspidos son altamente significativos, dado que el estado alérgico a los venenos de víspidos son habituales, y en algunos individuos sensibles, una reacción alérgica puede transformarse en anafilaxis, que es potencialmente mortal. Por lo tanto, es de gran importancia conocer la información de secuencia de nucleótidos y aminoácidos para los alérgenos de veneno de víspidos, de manera que se puede determinar información de diagnóstico precisa con respecto a la naturaleza del estado alérgico, especialmente sensibilidades a alérgenos específicos, y que se puedan realizar tratamientos terapéuticos eficaces del estado alérgico subyacente.

A efectos de claridad, la presente invención se describe en detalle en secciones relativas al aislamiento de genes que codifican enzimas de veneno de víspidos, expresión de un polipéptido que comprende un fragmento inmunomodulador de una enzima de veneno de víspido, o derivados y análogos de la enzima de veneno de víspido, ensayos con enzima de veneno de víspido recombinante o fragmentos, derivados o análogos de las mismas y, finalmente utilidades terapéuticas y de diagnóstico de la enzima de veneno de víspidos o fragmentos, derivados o análogos de las mismas. En particular, la invención se refiere a las enzimas de veneno de víspidos fosfolipasa e hialuronidasa.

*Aislamiento de un Ácido Nucleico que Codifica una Enzima de Veneno de Vespido*

La presente invención se refiere particularmente a ácidos nucleicos aislados que codifican enzimas de veneno de  
 5 vespídos. La invención se refiere además a una línea celular que contiene de manera estable un ácido nucleico recombinante que codifica una enzima de veneno de vespido, y que es capaz de expresar dicho ácido nucleico, produciendo la proteína o un fragmento inmunomodulador de una enzima de veneno de vespido.

Se prevén, además, derivados de enzima de veneno de vespido, tales como fragmentos y proteínas de fusión (ver  
 10 más adelante), así como ácidos nucleicos que codifican los mismos.

En un aspecto preferente, la presente invención da a conocer la secuencia completa de ácido nucleico de una  
 enzima de veneno de vespido. En particular, la presente invención da a conocer la secuencia de ácido nucleico de una  
 hialuronidasa de vespido, en particular, hialuronidasa *D. maculata*.

En una realización específica, para obtener un ácido nucleico que codifica una enzima de veneno de vespido,  
 15 se combina la reacción en cadena de polimerasa (PCR) con la técnica de amplificación rápida de los extremos de DNAC (RACE) descrita por Frohman y otros (1988, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:8998-9002; ver también Frohman, 1990, Amplifications: A Forum for PCR Users 5:11) para amplificar un fragmento que codifica una secuencia que comprende la enzima de veneno de vespido antes de la selección. Se pueden utilizar cebadores oligonucleótidos que  
 20 representan enzima de veneno de vespido, según la invención, como cebadores en PCR. De manera general, estos cebadores son preparados sintéticamente. Se pueden deducir secuencias para dichos cebadores oligonucleótidos a partir de información de secuencia de aminoácidos. Estas secuencias de oligonucleótidos pueden ser no degeneradas, pero más frecuentemente las secuencias son degeneradas. Más preferentemente, los cebadores son basados en las secuencias de ácido nucleico para las enzimas de veneno de vespídos que se dan a conocer en esta invención. Los  
 25 oligonucleótidos pueden ser utilizados como cebadores para amplificar por frecuencias PCR desde una fuente (RNA o DNAC), preferentemente una biblioteca DNAC de interés potencial. Por ejemplo, se puede utilizar PCR para amplificar una secuencia de codificación de enzima de veneno de vespido a partir de una biblioteca de DNAC de glándula de ácido de vespido. La reacción PCR puede ser llevada a cabo, por ejemplo, utilizando un aparato de ciclado térmico Perkin-Elmer Cetus y Taq polimerasa (Gene Amp™).

La presente invención da a conocer, además, el aislamiento de un homólogo de una enzima de veneno de vespido  
 de cualquier especie de vespido. Se puede escoger el sintetizar varios cebadores de generadores distintos para utilizar,  
 por ejemplo, en reacciones PCR. También es posible variar la restricción de las condiciones de hibridación, utilizadas  
 en el cebado de reacciones de PCR, para permitir grados mayores o menores de similitud de secuencia de nucleótidos  
 35 entre un homólogo de una enzima de veneno de vespido y una enzima de veneno de vespido específica, tal como se da a conocer en esta invención. Después de amplificación satisfactoria de un segmento de un homólogo de una enzima de veneno de vespido, este segmento puede ser clonado y secuenciado, y utilizado como sonda para aislar un clon completo DNAC o genómico. Esto permitirá, a su vez, la determinación de la secuencia completa de nucleótidos, el análisis de su expresión y la producción de su producto de proteína para análisis funcional, tal como se describe  
 40 más adelante. De esta manera, se pueden identificar y expresar genes adicionales que codifican enzimas de veneno de vespido, en particular, fosfolipasas y hialuronidasas.

En otra realización, se pueden aislar genes que codifiquen una enzima de veneno de vespido a partir de una  
 biblioteca adecuada por rastreo con una sonda. Se pueden generar sondas útiles para aislar un gen de enzima de  
 45 veneno de vespido a partir de la información de secuencia que se facilita.

Se puede constituir una biblioteca de expresión por métodos conocidos en esta técnica. Preferentemente, se prepara  
 una biblioteca de DNAC a partir de células o tejidos que expresan una enzima de veneno de vespido, es decir, células de  
 la glándula del veneno situada cerca de la bolsa del veneno. En algunos casos, la glándula de veneno recibe el nombre  
 50 de glándula de ácido. Por ejemplo, se pueden aislar mRNA o RNA total. Se prepara DNAC y se efectúa ligadura en un rector de expresión (por ejemplo, un plásmido o derivado de bacteriófago), de manera tal que es capaz de ser expresado por la célula hospedante, en la que es introducido a continuación. Se pueden utilizar entonces varios ensayos de rastreo para seleccionar los clones positivos. Por ejemplo, se pueden utilizar PCR con cebadores apropiados, que se pueden sintetizar basándose en las secuencias que se facilitan. Es preferible PCR, dado que la producción amplificada puede  
 55 ser detectada directamente, por ejemplo, por tinción con bromuro de etidio. De manera alternativa, se pueden utilizar para el rastreo de las colonias sondas etiquetadas derivadas de secuencias de ácido nucleico de la solicitud de patente actual.

De forma alternativa, la presencia del gen se puede detectar por ensayos basados en las características físicas,  
 60 químicas o inmunológicas de su producto expresado. Por ejemplo, se pueden seleccionar clones de DNAC o clones de ADN que seleccionan por hibridación los mRNA apropiados, produciendo una proteína que tiene, por ejemplo, igual o idéntica emigración electroforética, comportamiento de enfoque isoeléctrico, mapas de digestión proteolítica o características antigénicas que se conocen para una enzima de veneno de vespido.

Algunas proteínas recombinantes expresadas por bacterias, por ejemplo, hialuronirases de veneno de vespídos, son  
 reactivas con anticuerpos específicos para las proteínas naturales. Otras proteínas recombinantes expresadas bacterial-  
 65 mente, tales como fosfolipasas de vespídos, no reaccionan con anticuerpos específicos para la proteína natural. Por lo

tanto, en los casos en los que las proteínas recombinantes son inmunorreactivas, es posible seleccionar clones positivos por inmunotransferencia.

En otra realización, la actividad catalítica específica de la enzima, tal como la actividad de hialuronidasa de una hialuronidasa de veneno de víspido expresada, puede ser utilizada para selección. No obstante, las proteínas eucarióticas expresadas bacteriamente pueden no quedar comprendidas en una conformación activa.

De modo general, de acuerdo con la presente invención, se puede utilizar cualquier método de rastreo de clones positivos.

Se incluyen entre las alternativas de aislamiento del ADN o DNAc geonómico de enzima de veneno de víspidos, sin que ello sirva de limitación, la síntesis química de la secuencia del gen a partir de la secuencia que se facilita en esta descripción.

Los métodos anteriores no están destinados a limitar los métodos por los que los clones de una enzima de veneno de víspido puede ser obtenida.

Se puede utilizar un gran número de sistemas vector-hospedante, conocidos en la técnica. Entre los posibles vectores se incluyen, sin que ello sirva de limitación, plásmidos o virus modificados, pero el sistema de vectores debe ser compatible con la célula hospedante utilizada. Estos vectores incluyen, sin que ello sirva de limitación, bacteriófagos, tales como derivados lambda, o plásmidos tales como varios derivados pBR322, por ejemplo, pUC, CR, vectores pGEX, pmal-c, pFLAG, etc. La inserción en un vector de clonado puede ser conseguida, por ejemplo, ligando fragmentos de ADN en un vector de clonado que tiene términos cohesivos complementarios. En un aspecto preferente de la invención, los ácidos nucleicos amplificados por pCR según la invención contienen nucleótidos A suspendidos 3', y pueden ser utilizados directamente para el clonado en un vector pCR con prolongaciones compatibles de nucleótidos T (Invitrogen Corp., San Diego, CA). No obstante, si en los lugares de restricción complementarios utilizados para fragmentar el ADN no se encuentran presentes en el vector de clonado, los extremos de las moléculas de ADN pueden ser modificados enzimáticamente. De forma alternativa, cualquier lugar deseado puede ser producido ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) a los terminales de ADN; estos enlazadores ligados pueden comprender oligonucleótidos específicos químicamente sintetizados, que codifican secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción. En un método alternativo, el vector clivado y un gen de enzima de veneno de víspido pueden ser modificados por adición de cola homopolímera. Se pueden introducir moléculas recombinantes en células hospedantes vía transformación, transfección, infección, electroporación, etc., de manera que se generan muchas copias de la secuencia de gen.

En realizaciones específicas, la transformación de células hospedantes con moléculas ADN recombinantes que incorporan el gen de enzima de veneno de víspidos aislado, DNAc, o secuencia de ADN sintetizada, posibilita la generación de múltiples copias del gen. De este modo, el gen puede ser obtenido en grandes cantidades cultivando transformantes, aislando las moléculas de ADN recombinante de los transformantes y, en caso necesario, recuperando el gen insertado del ADN recombinante aislado.

#### *Expresión de un polipéptido o fragmento de alérgeno de veneno de víspidos*

La secuencia de nucleótido que codifica para una enzima de veneno de víspidos o un fragmento inmunomodulatorio, derivado o análogo del mismo, se puede insertar en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia insertada de codificación de la proteína. Estos elementos son designados en esta descripción como "promotores". Por lo tanto, el ácido nucleico que codifica la enzima del veneno de víspido está asociado operativamente con el promotor. Un vector de expresión incluye también preferentemente un origen de replicación. Las señales necesarias de transcripción y traducción pueden ser también suministradas por el gen natural que codifica una enzima de veneno de víspido y/o sus regiones adyacentes. Los sistemas potenciales hospedante-vector incluyen, sin que ello sirva de limitación, sistemas de células de mamíferos, infectados por virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas de células de insectos infectados por virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levadura conteniendo vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plásmido, o ADN cósmido. Los elementos de expresión de vectores varían en sus intensidades y especificidades. Dependiendo del sistema hospedante-vector utilizado, se puede utilizar cualquiera de una serie de elementos adecuados de transcripción y traducción.

En una realización alternativa, una enzima de veneno de víspido recombinante según la invención o un fragmento inmunomodulador, derivado o análogo del mismo, es expresado cromosómicamente, después de integración de la secuencia de codificación de la enzima de veneno de víspido por recombinación. A este respecto, se puede utilizar cualquiera de una serie de sistemas de amplificación para conseguir elevados niveles de expresión estable de gen (Ver Sambrook y otros, 1989, *supra*, cita anterior en la sección 16.28).

La célula en la que se cultiva el vector recombinante que comprende el ácido nucleico que codifica la enzima de veneno de víspidos es un medio de cultivo celular apropiado en condiciones que proporcionan la expresión de la enzima de veneno de víspido por la célula. La enzima de veneno de víspido expresada puede ser recuperada del cultivo de acuerdo con métodos bien conocidos en esta técnica. Estos métodos se describen de forma detallada, más adelante.

En otra realización, se puede expresar una proteína de fusión de enzima de veneno de víspido. Una proteína de fusión de enzima de veneno de víspido comprende, como mínimo, una parte funcionalmente activa de una proteína de enzima de veneno no víspido, unida con intermedio de un enlace péptido, como mínimo a una parte inmunomoduladora de una enzima de veneno de víspido. Las secuencias de la enzima de veneno no víspido pueden ser terminales amino o carboxilo con respecto a las secuencias de enzima de veneno de víspido. Una molécula de ADN recombinante que codifica esta proteína de fusión comprende una secuencia que codifica como mínimo una parte funcionalmente activa de una enzima de veneno no víspido unida a la secuencia de codificación para una enzima de veneno de víspido y, preferentemente, codifica un lugar de división para una proteasa específica, por ejemplo, factor Xa, preferentemente en la unión de las dos proteínas.

En otra realización específica, un fragmento de la enzima de veneno de víspido es expresado como proteína libre (no fusión).

En una realización específica, la fosfolipasa de veneno de víspido y fragmentos inmunomoduladores de la misma son expresados con una secuencia adicional que comprende, aproximadamente, seis residuos de histidina, por ejemplo, utilizando el vector pQE12 (QIAGEN, Chatsworth, CA). La presencia de la histidina hace posible el aislamiento selectivo de proteínas recombinantes en una columna Ni-quelatante.

En otra realización, una forma periplásmica de la proteína de fusión (que contiene secuencia de señal) puede ser producida para exportación de la proteína al periplasma de la *Escherichia coli*. La exportación al periplasma puede ayudar a la disposición apropiada de la proteína expresada.

Cualquiera de los métodos anteriormente descritos para la inserción de fragmentos de ADN en un vector puede ser utilizado para construir vectores de expresión que contienen un gen que consiste en señales de control apropiadas de transcripción/traducción y las secuencias de codificación de las proteínas. Estos métodos pueden incluir ADN recombinante *in vitro* y técnicas sintéticas y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima de veneno de víspido o un fragmento inmunomodulador de la misma, se puede regular por una segunda secuencia de ácido nucleico de manera que la proteína o péptido de la enzima de veneno de víspido es expresada en un hospedante transformado con la molécula de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de una proteína de enzima de veneno de víspido se puede controlar por cualquier elemento promotor/potenciador conocido en esa técnica, pero estos elementos reguladores deben ser funcionales en el hospedante seleccionado para expresión. Los promotores que pueden ser utilizados para controlar la expresión del gen de la enzima de veneno de víspido incluyen, sin que ello sea limitativo, la zona promotora próxima SV40 (Benoist y Chambon, 1981, Nature 290:304-310), el promotor contenido en la repetición del terminal largo 3' de virus Rous sarcoma (Yamamoto, y otros, 1980, Cell:22:787-797), el promotor de timidina quinasa de herpes (Wagner, y otros, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster y otros, 1982, Nature 296:39-42); vectores de expresión procariótica, tales como promotor  $\beta$ -lactamasa (Villa-Kamaroff, y otros, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), o el promotor *tac* (DeBoer, y otros, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25); ver también la publicación "Useful proteins from recombinant bacteria" ("Proteínas útiles a partir de bacterias recombinantes") en Scientific American, 1980, 242:74-94; elementos promotores de la levadura u otros hongos tales como promotor Gal 4, promotor ADC (alcohol dehidrogenasa), promotor PGK (fosfoglicerol quinasa), promotor de fosfatasa alcalina; y las regiones de control transcripcional animal, que muestran especificidad de tejidos y han sido utilizadas en animales transgénicos.

Los vectores de expresión conteniendo un ácido nucleico que codifica una enzima de veneno de víspido se pueden identificar por cuatro enfoques generales: (A) amplificación PCR del ADN plásmido deseado o mRNA específico, (B) hibridación de ácido nucleico, (C) presencia o ausencia de funciones de gen "marcador", y (D) expresión de secuencias insertadas. En el primer enfoque, los ácidos nucleicos pueden ser amplificados por PCR para proporcionar detección del producto amplificado. En el segundo enfoque, la presencia de un gen extraño insertado en un vector de expresión puede ser detectada por hibridación de ácido nucleico utilizando sondas que comprenden secuencias que son homólogas a un gen de enzima de veneno de víspido insertado. En el tercer enfoque, el sistema vector recombinante/hospedante puede ser identificado y seleccionado basándose en la presencia o ausencia de ciertas funciones de gen "marcador" (por ejemplo, actividad  $\beta$ -galactosidasa, actividad de quinasa timidina, resistencia a antibióticos, fenotipo de transformación, formación de cuerpo de oclusión en baculovirus, etc.) provocado por la inserción de genes extraños en el vector. En un ejemplo específico, la proteína de fusión comprende el producto de gen "marcador" y una enzima de veneno de víspido. En otro ejemplo, si el ácido nucleico que codifica una enzima de veneno de víspido es insertado dentro de la secuencia de gen marcador del vector, se pueden identificar los recombinantes que contienen el inserto de enzima de veneno de víspido por la ausencia de la función de gen marcador. En el cuarto enfoque, se pueden identificar vectores de expresión recombinante ensayando la actividad del producto de gen expresado por el recombinante, a condición de que la proteína expresada se dispone en una conformación apropiada. Estos ensayos pueden ser basados, por ejemplo, en las características físicas o funcionales de un producto de gen de enzima de veneno de víspido en sistemas de ensayo *in vitro*, por ejemplo, actividad fosfolipasa o lipasa de fosfolipasas de veneno de víspido, o actividad hialuronidasa de hialuronidasas de veneno de víspido o, alternativamente, por unión con anticuerpo.

Una vez se ha identificado una molécula ADN recombinante específica y se ha aislado, se pueden utilizar para propagarla varios métodos conocidos en esta técnica. Una vez se han establecido el sistema hospedante adecuado y las condiciones de crecimiento, se pueden propagar los vectores de expresión recombinante y se pueden preparar en cantidad. Tal como se ha explicado previamente, los vectores de expresión que pueden ser utilizados incluyen, sin que

ello sirva de limitación, los siguientes vectores o sus derivados: virus humanos o animales tales como vaccinia virus o adenovirus; virus de insectos tales como baculovirus; vectores de levadura; vectores de bacteriófago (por ejemplo, lambda), y vectores plásmidos y cósmidos de ADN, entre otros muchos.

5 Además, una cepa de célula hospedante puede ser escogida para modular la expresión de las secuencias insertadas, o modificar y procesar el producto de gen en la forma específica deseada. Diferentes células hospedantes tienen características y mecanismos específicos para el proceso translacional y post-translacional (por ejemplo, glicosilado, división [por ejemplo, de secuencia de señal]) de proteínas. Se pueden escoger líneas celulares apropiadas o sistemas hospedantes para asegurar la modificación y proceso deseados de la proteína extraña expresada. Por ejemplo, se puede utilizar la expresión en un sistema bacteriano para producir un producto de proteína de núcleo no glicosilado. No obstante, la proteína de la enzima expresada en bacterias puede no estar dispuesta de manera apropiada. La expresión en levadura puede producir un producto glicosilado. La expresión en células de insectos puede ser utilizada para incrementar la probabilidad de glicosilado "natural" y disposición de una enzima de veneno de vespido heterólogo. Además, diferentes sistemas de expresión vector/hospedante pueden afectar reacciones de proceso, tales como las divisiones proteolíticas, en diferente medida. Es interesante observar que se ha visto que el glicosilado y reposición apropiada no son esenciales para la actividad inmunomoduladora de un alérgeno de veneno de vespido, dado que el alérgeno producido bacteriamente es activo en un ensayo de proliferación de células T.

20 Se introducen vectores en las células hospedantes deseadas por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, dextrano DEAE, precipitación por fosfato cálcico, lipofección, (fusión de liposomas), utilización de un cañón de genes, o un transportador de vector de ADN (ver, por ejemplo, Wu y otros, 1992, J. Biol. Chem. 267:963-967; Wu y Wu, 1988, J. Biol. Chem. 263:19621-14629; Hartmut y otros, solicitud de Patente de Canadá nº 2.012.311, presentada en 15 de marzo de 1990).

25 Ambas secuencias DNAC y genómica pueden ser clonadas y expresadas.

Se prevé, además, que las enzimas de veneno de vespido de la presente invención o sus fragmentos, derivados o análogos se pueden preparar sintéticamente, por ejemplo, por síntesis de péptidos en fase sólida.

30 Una vez que la proteína de la enzima de veneno de vespido recombinante ha sido identificada, puede ser aislada y purificada por métodos normales incluyendo cromatografía (por ejemplo, intercambio de iones, afinidad, y cromatografía de columna), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica normal para la purificación de proteínas.

35 En una realización específica, una enzima de veneno de vespido y fragmentos de la misma pueden ser diseñados para incluir, aproximadamente, seis residuos de histidilo, lo que hace posible el aislamiento selectivo de la proteína recombinante en una columna de Ni-quelatado. En un aspecto preferente, las proteínas son purificadas adicionalmente por cromatografía de fase inversa.

40 En otra realización, en la que la enzima de veneno de vespido recombinante es expresada como proteína de fusión, la parte de enzima de veneno no vespido de la proteína de fusión puede ser direccionada para purificación por afinidad. Por ejemplo, un anticuerpo específico para la parte de enzima de veneno no vespido de la proteína de fusión puede ser inmovilizado sobre un soporte sólido, por ejemplo, Sefarosa activada por bromuro de cianógeno y, utilizada para purificar la proteína de fusión. En otra realización, un asociado de unión de la parte de enzima de veneno no vespido de la proteína de fusión, tal como un receptor o ligando, puede ser inmovilizado y utilizado para purificar por afinidad la proteína de fusión.

50 En una realización, una proteína de fusión de enzima de veneno de vespido, preferentemente purificada, es utilizada sin otra modificación, es decir, sin división o eliminación de la parte de enzima de veneno no vespido de la proteína de fusión. En una realización preferente, la proteína de fusión de la enzima de veneno de vespido puede ser utilizada terapéuticamente, por ejemplo, para modular una respuesta inmune.

55 En otra realización, la proteína de fusión purificada es tratada para dividir la proteína de enzima de veneno no vespido o parte de la misma con respecto a las enzimas de veneno de vespido. Por ejemplo, en el caso en el que la proteína de fusión ha sido preparada para incluir un lugar de división sensible a proteasa, la proteína de fusión puede ser tratada con la proteasa para dividir el lugar específico de proteasa y liberar enzima de veneno de vespido. En una realización específica, la proteína de fusión es dividida por tratamiento con factor Xa.

60 En otra realización, la proteína de fosfolipasa de veneno de vespido puede ser objeto de reposición.

65 En una realización específica de la presente invención, estas enzimas de veneno de vespido recombinantes incluyen, aunque no están limitadas a ello, como secuencia principal de aminoácido, la totalidad o una parte de la secuencia de aminoácidos sustancialmente tal como se ha indicado en las figuras 1 (SEQ ID NO: 17), 5 (SEQ ID NO: 27), o 6 (SEQ ID NO: 55), así como fragmentos y otros derivados, y análogos de los mismos.

*Derivados y análogos de enzimas de veneno de víspido*

La invención se refiere además a derivados y análogos de enzimas de veneno de víspido. La producción y utilización de derivados y análogos relacionados con enzimas de veneno de víspido se encuentran dentro del ámbito de la presente invención. El derivado o análogo es inmunomodulador, es decir, es capaz de modular una respuesta inmune específica de antígeno. En otra realización, el derivado o análogo puede unirse a una inmunoglobulina específica de enzima de veneno de víspido, incluyendo IgG e IgE. Se pueden comprobar derivados o análogos de enzima de veneno de víspido en cuanto a la actividad inmunomoduladora deseada por procedimientos conocidos en esta técnica, incluyendo, sin que ello sirva de limitación, los ensayos que se describen más adelante.

En particular, los derivados de enzima de veneno de víspido pueden ser realizados alterando las secuencias de ácido nucleico de la invención por sustituciones, adiciones o deleciones que proporcionan moléculas funcionalmente equivalentes. Debido al carácter degenerativo de las secuencias codificantes de nucleótidos, se pueden utilizar otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácido que un ácido nucleico que codifica una enzima de veneno de víspido, en la práctica de la presente invención. Éstas incluyen, sin que ello sirva de limitación, secuencias de nucleótidos que comprenden la totalidad o una parte de un gen que codifica la enzima de veneno de víspido que han sido alteradas por la sustitución de diferentes codones, que codifican el mismo residuo de aminoácido dentro de la secuencia, produciendo de esta manera un cambio silencioso. De manera similar, los derivados de la invención incluyen, sin que ello sirva de limitación, los que contienen, como secuencia de aminoácido principal, la totalidad o una parte de la secuencia de aminoácido de una enzima de veneno de víspido, incluyendo secuencias alteradas, en las que los residuos de aminoácido equivalente funcionalmente están sustituidos por residuos dentro de la secuencia, resultando en una sustitución conservadora de aminoácido. Por ejemplo, uno o varios residuos de aminoácido dentro de la secuencia pueden ser sustituidos por otros aminoácidos de polaridad similar que actúan como equivalente funcional, resultando en una alteración silenciosa. Se pueden seleccionar sustitutos para un aminoácido dentro de la secuencia a partir de otros elementos de la clase a los que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, entre los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) se incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofán y metionina. Los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

Los derivados o análogos de enzima de veneno de víspidos incluyen, sin que ello sea limitativo, aquellos que son sustancialmente homólogos con una enzima de veneno de víspido o fragmentos de la misma, o aquellos cuyo ácido nucleico codificante es capaz de hibridar un ácido nucleico que codifica una enzima de veneno de víspido. La hibridación puede tener lugar bajo condiciones moderadamente restrictivas hasta altamente restrictivas, dependiendo del grado de similitud de secuencia, tal como es bien conocido en esta técnica.

Los derivados y análogos de la invención pueden ser producidos por diferentes métodos conocidos en la técnica. Las manipulaciones que resultan en su producción pueden tener lugar a nivel de gen o de proteína. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de la enzima de veneno de víspido clonada puede ser modificada por cualquiera de numerosas estrategias conocidas en esta técnica (Maniatis, T., 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York). La secuencia puede ser dividida o segmentada en lugares apropiados con endonucleasas de restricción, seguido de modificación adicional enzimática, en caso deseado, siendo aislada, y ligada *in vitro*. En la producción del gen que codifica un derivado o análogo de una enzima de veneno de víspido, se debe tener cuidado en asegurar que el gen modificado permanece dentro del mismo cuadro de lectura de traducción como la enzima del veneno de víspido, sin interrupción por señales de fin de traducción.

De manera adicional, el gen que codifica una enzima de veneno de víspido puede ser mutado *in vitro* o *in vivo*, para crear y/o destruir secuencias de traducción, iniciación y/o terminación, o para crear variaciones en regiones de codificación y/o formar nuevos lugares de endonucleasa de restricción o destruir otros preexistentes, para facilitar otras modificaciones *in vitro*. Se puede utilizar cualquier técnica de mutagénesis conocida en este campo, incluyendo, sin que ello sirva de limitación, mutagénesis dirigida al lugar *in vitro* (Hutchinson, C., y otros, 1978, *J. Biol. Chem.* 253:6551; Zoller y Smith, 1984, *ADN* 3:479-488; Oliphant y otros, 1986, *Gene* 44:177; Hutchinson y otros, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:710), utilización de enlazadores TAB® (Pharmacia), etc. Son preferibles técnicas PCR para mutagénesis dirigida al sitio (ver Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer ADN", in *PCR Technology: Principles and Applications for ADN Amplification*, H. Erlich, ed., Stockton Press, Capítulo 6, pp. 61-70).

También se pueden realizar a nivel de la proteína, manipulaciones de la enzima de veneno de víspidos recombinante. Se incluyen dentro del ámbito de la invención fragmentos u otros derivados o análogos de la enzima de veneno de víspidos recombinante, que son modificados de manera diferenciada durante o después de la traducción, por ejemplo, por glicosilado, acetilado, fosforilación, amidación, reducción y carboximetilación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, segmentación proteolítica, enlace a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Se puede llevar a cabo, por técnicas conocidas, cualquiera de numerosas modificaciones químicas, incluyendo, sin que ello sirva de limitación, segmentación química específica por bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, V8 proteasa, NaBH<sub>4</sub>; acetilación, formilación, oxidación, reducción; síntesis metabólica en presencia de tunicamicina; etc.

En una realización específica, la enzima de veneno de víspido o fragmento inmunomodulador en la misma se expresa en un sistema de expresión de células de insecto, por ejemplo, utilizando un vector de expresión de baculovirus.

Tal como se ha indicado anteriormente, esto debe proporcionar glicosilación y estructura “natural”, particularmente estructura secundaria y terciaria del polipéptido expresado. La glicosilación y estructura natural de polipéptido expresado pueden ser muy importantes para usos diagnósticos, dado que los anticuerpos específicos de la enzima detectados en ensayos de diagnóstico serán específicos para la enzima natural, es decir, tales como los introducidos por una picadora de un véspero.

#### *Ensayos de Actividad con Péptidos según la Invención*

Se conocen numerosos ensayos en inmunología para evaluar la actividad inmunomoduladora de un antígeno. Por ejemplo, las proteínas de enzima de veneno de véspero producidas por expresión de los ácidos nucleicos de la invención pueden ser utilizadas en ensayos de diagnóstico de enfermedades alérgicas, que se describen en detalle más adelante. En general, estas proteínas pueden ser comprobadas en cuanto a actividad de unirse a anticuerpos específicos para la enzima. Preferentemente, estos anticuerpos que son detectados en el ensayo de diagnóstico son de la clase IgE. Sin embargo, es importante observar que los alérgenos naturales-anticuerpos específicos se ha observado que se unen débilmente a alérgenos desnaturalizados de veneno de véspero. Las enzimas de veneno de véspero producidas en sistemas de expresión eucariótica y, particularmente, sistemas de expresión de células de insectos, pueden tener la estructura correcta para unión de anticuerpos. Las enzimas de veneno de vésperos expresadas en sistemas de expresión bacteriana pueden no tenerla y, por lo tanto, requerirían plegado antes de utilización en un ensayo de diagnóstico para unión de anticuerpos.

En otra realización, las proteínas de la invención pueden ser sometidas a prueba en un ensayo de proliferación en cuanto a respuestas de células T. Para estos ensayos de respuesta de células T, el sistema de expresión utilizado para producir la enzima no parece afectar la actividad inmunomoduladora de la proteína. En general, los linfocitos se obtienen de un hospedante sensibilizado. El hospedante puede ser un ratón que ha sido inmunizado por una hialuronidasa de veneno de véspero que ha sido producida de forma recombinante, de acuerdo con la presente invención.

En una realización preferente, se obtienen leucocitos de sangre periférica de un humano que es sensible a veneno de vésperos. Usando técnicas bien conocidas en este campo, se puede medir *in vitro* la respuesta de linfocitos T a la proteína. En una realización específica, explicada más adelante, las respuestas de las células T son detectadas midiendo la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina, que incrementa con la síntesis de ADN asociada a la proliferación.

La proliferación celular puede ser también detectada utilizando un ensayo MTT (Mossman, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63; Niks y Otto; 1990, J. Immunol. Methods 130:140-151). Se puede utilizar cualquier método de detección de la proliferación de células T conocido en esta técnica con la enzima de véspero producida de acuerdo con la presente invención.

De manera similar, se pueden practicar ensayos de producción de linfoquina, de acuerdo con la presente invención. En una realización, la producción de linfoquina puede ser ensayada utilizando ensayos inmunológicos o de coestimulación (ver, por ejemplo, Fehner y otros, 1991, J. Immunol. 146:799) o utilizando la técnica ELISPOT (Czerkinsky, y otros, 1988, J. Immunol. Methods 110:29). De manera alternativa, se puede detectar mRNA para linfoquinas, por ejemplo, por amplificación (ver Brenner, y otros 1989, Biotechniques 7:1096) o hibridación *in situ* (ver, por ejemplo, Kasaian y Biron, 1989, J. Immunol. 142:1287). Son de particular interés los individuos cuyas células T producen linfoquinas asociadas con agentes de cambio de isotipo IgE, por ejemplo, IL-4 e IL-5 (Purkeson y Isakson, 1992, J. Exp. Med. 175:973-982). Son también de interés los fragmentos de polipéptido de la enzima de veneno de véspero que contienen epítomos reconocidos por células T involucradas en eventos de cambio de IgE.

Por lo tanto, en un aspecto preferente, las proteínas producidas de acuerdo con la presente invención pueden ser utilizadas con ensayos *in vitro* con linfocitos de sangre periférica o, de manera más preferente, líneas celulares derivadas de linfocitos de sangre periférica, obtenidos de individuos sensibles a la enzima de veneno de véspero, para detectar secreción de linfoquinas, ordinariamente asociadas con respuestas alérgicas, por ejemplo, IL-4. Estos ensayos pueden indicar qué componente o componentes del veneno son responsables del estado alérgico. De manera más importante, los fragmentos de la enzima de veneno de véspero pueden ser sometidos a comprobación. De esta manera, se pueden identificar epítomos específicos responsables de las respuestas de las células T asociadas con respuesta alérgica. Las secuencias de estos epítomos pueden ser comparadas a otras enzimas de veneno de vésperos y a proteínas autólogas o ambientales para determinar si existen similitudes de secuencia que sugieran posible reactividad cruzada. Los péptidos pueden ser comprobados en cuanto a habilidad de inducir anergia de células T, por ejemplo, por administración de megadosis, modificación para producir un antagonista epítomo, administración en ausencia de las señales coestimuladoras apropiadas, y otros métodos que se cree que resultan en anergia de células T. Los péptidos que contienen estos epítomos son candidatos ideales para la terapéutica.

En otra realización, los polipéptidos de la invención pueden ser utilizados directamente en ensayos para determinar la magnitud de la reactividad cruzada con otras proteínas ambientales y/o proteínas homólogas, con las que comparten similitud de secuencia. En particular, los fragmentos de las enzimas de veneno de véspero que tienen similitud de secuencia con dichas proteínas ambientales, y más particularmente homólogas, pueden ser evaluadas en cuanto a reactividad cruzada con anticuerpos o células T específicas para estas proteínas. En una realización específica, la reactividad cruzada de fosfolipasas de veneno de véspero con lipasas humanas puede ser evaluada. En otra realización específica, se evalúa la reactividad cruzada de la hialuronidasa de veneno de véspero con la proteína PH-20 de la membrana de espermatozoos.

*Diagnóstico y Usos Terapéuticos de los Polipéptidos de Enzimas de Veneno de Vespídos*

La presente invención da a conocer una gran cantidad de enzimas de veneno de vespídos puras o fragmentos, derivados o análogos de las mismas, producidos por técnicas recombinantes. De forma alternativa, se pueden producir ventajosamente por síntesis de péptidos, dada la información de secuencia proporcionada por la presente invención, fragmentos de polipéptidos, derivados o análogos de las enzimas de veneno de vespídos.

La invención prevé la utilización de enzimas de veneno de vespídos, o fragmentos inmunomoduladores, derivados o análogos de las mismas, para la preparación de compuestos de diagnóstico o terapéuticos, para la utilización en diagnóstico y terapia de estados alérgicos específicos de alérgenos, veneno de vespídos. En particular, la hialuronidasa de vespídos, en particular, hialuronidasa *D. maculata*, o fragmentos inmunomoduladores, derivados o análogos de la hialuronidasa, se prevé para su utilización en diagnóstico y terapia de acuerdo con la presente invención.

*Métodos de Diagnóstico*

Tal como se utiliza en esta descripción, el término diagnóstico incluye ensayos de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*.

De modo general, estos ensayos están destinados a medir la actividad de anticuerpos IgE específicos para un alérgeno determinado. Estos ensayos de diagnóstico dependen fuertemente de la disponibilidad del alérgeno puro. Esto es esencialmente cierto para la determinación de la sensibilidad con respecto a un componente alérgeno específico de un veneno de vespído. Los ensayos de diagnóstico *in vitro* para la sensibilidad de la enzima incluyen radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo inmunoradiométrico (IRMA), pruebas radio-alergioabsorbentes (RAST), ensayos inmunoabsorbentes relacionados con las enzimas (ELISA), ELISPOT, ensayos alergioabsorbentes magnéticos, inmunoensayos, ensayos de liberación de histamina, y similares.

En otra realización, la presente invención prevé la determinación de la presencia de epítomos que son predominantemente reactivos con anticuerpos IgE, o con otros isótopos, por ejemplo, IgG. Estos epítomos pueden solaparse o ser distintos. En particular, se pueden utilizar fragmentos de las enzimas de veneno de vespídos de la invención para identificar dichos epítomos específicos de células B. La identificación de epítomos específicos puede proporcionar una base para desarrollar terapias, tal como se describe más adelante.

La presente invención prevé ensayos de diagnóstico *in vitro* en linfocitos de sangre periférica, tal como se ha descrito anteriormente. Estos ensayos de diagnóstico pueden proporcionar información detallada con respecto a respuestas específicas a la enzima de las células T, el fenotipo de la respuesta de células T, y preferentemente el epítomo de células T de la enzima relacionada en las respuestas de células T. El epítomo inmunodominante y el epítomo involucrado en eventos de cambio de clase de isotipo IgE pueden ser detectados, si no son el mismo. En particular, los epítomos de célula T de enzimas de veneno de vespído que estimulan la proliferación y/o la secreción de linfoquina con células T de un fenotipo asociado con eventos de cambio de clase de isotipo IgE, se pueden identificar para un individuo específico, o para una clase de individuos que comparten el haplotipo MHC o una expresión de región variable de receptor de células T predominante, o ambos.

Los ensayos *in vivo* de alergenidad consisten, en general, en ensayos de sensibilidad de punzado de la piel, en los que cantidades diluidas en serie de un alérgeno son administradas de forma subcutánea o intradérmica en la piel de un paciente, y se detectan reacciones "wheel" y eritema. Igual que con los ensayos *in vitro*, la disponibilidad de enzima de veneno pura incrementa notablemente el valor de los resultados de ensayos de diagnóstico *in vivo*, dado que se puede evitar la reactividad cruzada con impurezas en extractos preparados a partir de sacos de veneno de vespídos.

*Métodos Terapéuticos*

Los compuestos terapéuticos de la invención (ver más adelante) pueden ser utilizados en inmunoterapia, a los cuales se hace referencia como terapia de hiposensibilización. La inmunoterapia se ha demostrado eficaz en enfermedades alérgicas, particularmente alergia de insectos. Los alérgenos son administrados parenteralmente durante un largo periodo de tiempo en dosis gradualmente crecientes. Esta terapia puede ser particularmente efectiva, cuando el alérgeno o alérgenos a los que es sensible el paciente han sido identificados específicamente y la terapia es dirigida a dichos alérgenos. De este modo, la disponibilidad de enzima de veneno de vespídos pura en grandes cantidades es importante para la inmunoterapia de la alergia.

En otra realización, la presente invención prevé la utilización de polipéptidos que contienen, como mínimo, un epítomo inmunomodulador de célula T de una enzima de veneno de vespído para inducir anergia de células T específica a la enzima de veneno de vespído. La identificación de estos péptidos se describe en lo anterior. Más preferentemente, un péptido que comprende este epítomo de células T y al que le falta el epítomo de célula B puede ser administrado a un paciente.

Tal como se ha explicado en los Antecedentes de la Invención, la presencia de epítomos de célula B en un alérgeno puede provocar una reacción sistémica no deseable cuando el alérgeno es utilizado para inmunoterapia. Por lo tanto, una ventaja específica de la invención es la capacidad de proporcionar polipéptidos alérgenos que no provocan efectos sistémicos no deseables.

En una realización, uno o varios fragmentos de polipéptidos pueden ser inyectados de forma subcutánea para disminuir la respuesta de células T a la molécula entera, por ejemplo, tal como se describe por Brine y otros (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:7608-12).

En otra realización, uno o varios fragmentos de polipéptido pueden ser administrados intranasalmente para suprimir respuestas específicas de alérgenos en sujetos naturales y sensibilizados (ver, por ejemplo, Hoyne y otros, 1993, J. Exp. Med., 178:1783-88).

La administración de un péptido de enzima de veneno de víspido según la invención se espera que induzca anergia, resultando en el cese de producción de anticuerpos específicos del alérgeno o respuesta de células T específica de alérgeno, o ambas, y por lo tanto, tiene efecto terapéutico.

En un aspecto preferente de la invención, la terapia basada en péptidos para inducir anergia de células T se individualiza para cada individuo o grupo de individuos. Utilizando los métodos de diagnóstico de la presente invención, el epítipo o epítopos específicos de células T de una enzima de veneno de víspido involucrada en la respuesta alérgica pueden ser identificados. Los péptidos que comprenden estos epítopos pueden ser utilizados en un régimen de inmunoterapia individualizada.

#### *Compuestos Farmacéuticamente Aceptables*

Los compuestos de diagnóstico *in vivo* o terapéuticos según la invención puede encontrar también portadores farmacéuticamente aceptables apropiados, excipientes, diluyentes y coadyuvantes. Tal como se utiliza en esta descripción, el término “farmacéuticamente aceptable” significa preferentemente aprobados por una agencia reguladora gubernamental, en particular, el gobierno federal o un gobierno estatal, o en la lista de la Farmacopea U.S. u otra Farmacopea reconocida de modo general para su utilización en animales y, más particularmente, en humanos. Se describen portadores farmacéuticos adecuados en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por E.W. Martin.

Estos portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferente cuando el compuesto farmacéutico es administrado por vía intravenosa. También se pueden utilizar como portadores líquidos soluciones salinas y acuosas de dextrosa y de glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Se incluyen entre los excipientes farmacéuticos adecuados manitol, albúmina de suero humano, (HSA), almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, carbonato magnésico, estearato magnésico, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche descremada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Estos compuestos pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones para suministro continuado y similares.

Estos compuestos contendrán una cantidad efectiva para diagnóstico o terapéutica del compuesto activo junto con una cantidad adecuada de portador, a efectos de proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. Si bien la inyección intravenosa es una forma muy efectiva de administración, se pueden utilizar otras modalidades, tales como inyección, vía oral, administración nasal o parenteral.

La invención se clarificará adicionalmente por los ejemplos siguientes, que están destinados exclusivamente a ejemplos de la invención.

#### *Ejemplo 1*

##### *Hialuronidasa de avispon de cara blanca (“white face hornet”)*

La hialuronidasa es uno de los tres alérgenos principales procedentes del veneno de avispon de cara blanca. Es una proteína de unos 43 kD estimados por electroforesis de gel SDS (King y otros, 1978, Biochem. 17:5165-74). Su especificidad enzimática es del tipo endo-N-acetilhexosaminidasa (King y otros, 1985, Allergy Clin. Immunol. 75:621-628), dado que cataliza la liberación de grupos reductores de N-acetilglucosamina del ácido hialurónico, que es un polímero de disacáridos repetitivos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina.

Los datos de secuencia parcial de aminoácidos fueron obtenidos por degradación de Edman de la proteína intacta y sus péptidos digeridos por proteasa *S. aureus*. Dos oligonucleótidos degenerados, SEQ ID NOS:29 y 31 (Tabla 2) fueron sintetizados en base a los datos de secuencia parcial de aminoácidos y se utilizaron como cebadores en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar a partir de los DNAC del veneno, el DNAC específico para estos cebadores. La localización del oligonucleótido SEQ ID NO:29 en la secuencia de la proteína era conocida y codifica los residuos 8-13 de la hialuronidasa (SEQ ID NO:28). La localización del oligonucleótido SEQ ID NO:31 fue establecida por comparación de la secuencia traducida del producto PCR con los datos de la secuencia parcial de aminoácidos de la hialuronidasa y codifica el residuo 40-45 (SEQ ID NO:30).

TABLA 2

*Cebadores oligonucleótidos para clonado y secuenciado de la hialuronidasa del avispon*

| SEQ.ID NO. | Cebador                                   | Notas                                          |
|------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 28         | F <sup>8</sup> N I Y W N <sup>13</sup>    |                                                |
| 29         | CGT GGA TCC TCC AAC/T AT I TAC/T TGG AA   | PCR para residuos 8-45 y cebador secuenciado.  |
| 30         | D <sup>45</sup> G Q F D D <sup>40</sup>   |                                                |
| 31         | CGT AGA TCT TC ICCT/CTGA/GAAA/GTC A/GTC   | Ver anterior.                                  |
| 32         | W <sup>12</sup> N V P T F M <sup>18</sup> |                                                |
| 33         | TGG AAC GTT CCT ACC TTT ATG               | Primera pasada 3'RACE.                         |
| 34         | G <sup>23</sup> L Y F D E <sup>28</sup>   |                                                |
| 35         | CGC CTA TAC TTC GAC GAG                   | Segunda pasada 3'RACE y cebador secuenciado.   |
| 36         | Y <sup>182</sup> G Y Y G W <sup>177</sup> |                                                |
| 37         | C ATA TCC GTA ATA GCC CC                  | Síntesis cDNA de 5'RACE.                       |
| 38         | D <sup>107</sup> I V G I G <sup>102</sup> |                                                |
| 39         | TC GAT CAC ACC GAT ACC G                  | Primera pasada 5'RACE.                         |
| 40         | L <sup>62</sup> P L L A P <sup>57</sup>   |                                                |
| 41         | AG CGG CAA CAA TGC CGG C                  | Segunda pasada 5'RACE y cebador secuenciado.   |
| 42         | AAGGATCCGTCGACATCGATAATACGA               | Síntesis DNAC de 3'                            |
| 43         | CTC ACT ATA GGG ATT T <sub>15</sub>       | RACE de primera pasada 5'RACE.                 |
| 44         | AAG GAT CCG TCG ACA TC                    | Primera pasada 3'RACE o segunda pasada 5'RACE. |
| 45         | GAC ATC GAT AAT ACG AC                    | Segunda pasada 3'RACE y cebador secuenciado.   |
| 46         | S <sup>1</sup> E R P K R <sup>6</sup>     |                                                |
| 47         | CGT GGA TCC GAG AGA CCG AAA AGA           | PCR para residuos 1-331 y cebador secuenciado. |
| 48         | N <sup>331</sup> V T E T V <sup>326</sup> |                                                |
| 49         | CGT AGA TCT GTT GAC GCT TTC CGT CAC       | Ver anterior.                                  |
| 50         | I <sup>106</sup> D F E R W <sup>111</sup> |                                                |
| 51         | ATC GAC TTT GAA AGA TGG                   | Cebador secuenciado.                           |
| 52         | M <sup>161</sup> E E T L K <sup>166</sup> |                                                |
| 53         | CGT GGA TCC ATG GAG GAA ACT TTG AA        | Cebador secuenciado.                           |

De los datos de secuencia de ADN codificando los residuos 8-45 de hialuronidasa, se sintetizaron cebadores oligonucleótidos adicionales, SEQ ID NOS: 33 y 35 (Tabla 2). Se utilizaron conjuntamente con los oligonucleótidos SEQ ID NOS: 44 y 45 para amplificar los extremos 3' de la hialuronidasa codificando DNAC por el procedimiento de Frohman y otros (1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8998-9002), que es conocido habitualmente como Amplificación Rápida de Extremos de DNAC (RACE). De esta manera, se obtuvo un fragmento de DNAC que contenía los nucleótidos 127-1229 (Figura 6; SEQ ID NO:54). Otro conjunto de cebadores SEQ ID NOS:37, 39 y 41 (Tabla 2) fue sintetizado basándose en los datos de secuencia de ADN de 3'RACE. Se utilizaron juntamente con los cebadores SEQ ID NOS: 43 y 44 para amplificar el extremo 5' del DNAC siguiendo el protocolo RACE, y se obtuvo el fragmento de DNAC conteniendo los nucleótidos 1-246.

La secuencia N-terminal de hialuronidasa para los residuos 1-45 fue deducida por degradación de Edman, siendo codificada por las posiciones de nucleótidos 61-204 de la Figura 6 (SEQ ID NO:54). La región de la posición de nucleótidos 1-60 codifica probablemente una parte del segmento "prepro" de la hialuronidasa. No obstante, la presencia de un codón de interrupción en la posición de nucleótido 19-21 es inesperada, y puede representar posiblemente corte y empalme incompletos de mRNA. La región de codificación del ADN de la Figura 6 termina en la posición 1053, dado que un codón de interrupción sigue a esta posición. La región de la posición de nucleótidos 1057-1229 representa la región 3' sin traducir con una cola de poli A pero sin lugar de señal de poliadenilación de AATAAA.

Los cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NOS:47 y 49 (Tabla 2) se sintetizaron a partir de los datos de la Figura 6 (SEQ ID NO:54). Se utilizaron para amplificar el DNAC que codifica la hialuronidasa de longitud completa para expresión en bacterias.

## ES 2 278 379 T3

Los fragmentos de ADN de 3' o 5' RACE y PCR para expresión de la hialuronidasa fueron clonados en vector pCR (Invitrogen Corp., San Diego, CA). Los ADN plásmidos fueron aislados de clones apropiados, a continuación secuenciados por el método de terminación de cadena de dideoxinucleótido de Sanger utilizando una versión Sequenase 2,0 kit (U.S. Biochemical, Cleveland, OH). La secuencia de ADN de la Figura 6 (SEQ ID NO:54) fue ensamblada a partir de los datos de 5 clones de 3'RACE, 4 clones de 5'RACE y un clon de PCR específica para expresión de hialuronidasa. Hay suficientes solapes de los datos de secuencia de estos clones, de manera que todas las posiciones de nucleótidos de la Figura 6 (SEQ ID NO:54) representa el consenso de 4 o más clones. La única excepción es la región de posición 1-45 que fue obtenida a partir de 2 clones. Hay varias mutaciones de estos clones que están indicadas en la Tabla 3. La mayor parte de ellas son mutaciones silenciosas pero 2 de ellas resultan en sustituciones de aminoácidos. Estas mutaciones pueden ser debidas a infidelidad de la incorporación de base en PCR o pueden representar formas alélicas.

TABLA 3

*Mutaciones de secuencia de clones de 3' y 5' RACE y expresión PCR'*

| Fuente/clon    |          | Nucleótidos en las posiciones indicadas |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
|----------------|----------|-----------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------|
|                |          | 151                                     | 199      | 251      | 259      | 642      | 1064     | 1137     | 1154     | 1172     | 1184 |
| <b>5' RACE</b> |          |                                         |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
| # 9            | A        |                                         |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
| #19            | A        | A                                       |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
| #32            | A        | A                                       |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
| #39            | <u>G</u> | A                                       |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
| Expresión #12  | A        | <u>T</u>                                | A        | T        | <u>C</u> |          |          |          |          |          |      |
| <b>3' RACE</b> |          |                                         |          |          |          |          |          |          |          |          |      |
| # 1            | A        | A                                       | <u>G</u> | <u>C</u> | A        | T        | <u>G</u> | <u>G</u> | A        | T        |      |
| # 2            |          | A                                       | A        | T        | A        | T        | A        | A        | A        | T        |      |
| # 3            |          |                                         |          |          |          | T        | A        | A        | <u>G</u> | T        |      |
| #4             |          | A                                       | A        | T        | A        |          |          |          |          |          |      |
| #7             |          |                                         |          |          |          | <u>C</u> | A        | A        | A        | <u>A</u> |      |
| Consenso       | A        | A                                       | A        | T        | A        | T        | A        | A        | A        | A        | T    |

\* La secuencia de consenso queda indicada en la Figura 6 (SEQ ID NO:54). Una mutación en la posición 151 tiene como resultado un cambio de codón de AAT para asparagina a GAT para ácido aspártico y en la posición 199 de ATC para isoleucina a TTC para fenilalanina. Las mutaciones en las posiciones 251, 259 y 642 no resultaron en cambios de codón. Las mutaciones restantes se encuentran en la región sin traducir 3'.

La secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO:55) de los datos de ADN en la Figura 6 (SEQ ID NO:54) indica que la hialuronidasa tiene 331 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 38,929 daltons. El peso molecular de la hialuronidasa fue determinada en 43 kDa aproximadamente con datos electroforéticos de gel SDS. La diferencia de peso molecular indica muy probablemente que la hialuronidasa es una glicoproteína, dado que la secuencia traducida tiene un motivo de glicosilación Asn potencial de Asn-X-Thr/Ser en el residuo 79-81.

Los necesarios RNA del veneno y todos los procesos experimentales de los estudios anteriores son los mismos que se han descrito en el trabajo anterior de los inventores sobre el antígeno 5 de avispon y fosfolipasa (ver Ejemplo 1, texto anterior, y Fang y otros, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:895-899; Lu y otros, 1993, J. Immunol. 150:2823-30; Soldatova y otros, 1993, FEBS Lettr. 320:145-149).

Se evaluó la similitud de la secuencia de aminoácidos deducidos de la hialuronidasa de veneno de avispon con respecto a la secuencia de aminoácidos de otras proteínas. La búsqueda de la secuencia fue realizada en el National Center for Biotechnology Information utilizando el servicio de red BLAST (Altschul y otros, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410). La búsqueda reveló que la hialuronidasa de veneno de avispon (SEQ. ID NO:57) tiene 54% de identidad de secuencia con la hialuronidasa de veneno de abeja de miel que contiene 351 residuos (SEQ ID NO:56) (Omachl y Kreil, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:3569-73). Ambas hialuronidasas de veneno muestran homología de secuencia significativa con una proteína de membrana de la esperma de cobaya (SEQ ID NO:58) (Lathrop y otros, 1990, J. Cell Biol. 111:2939-49). Estas comparaciones de secuencia se muestran en la Figura 7. Existe una identidad de secuencia de 25% de las proteínas de avispon y de cobaya. Los estudios de hibridación con bibliotecas genómicas mostraron que esta proteína de membrana, conocida como PH-20, es ampliamente distribuida en mamíferos incluyendo humanos. Se cree que PH-20 juega un papel en la adherencia esperma-huevo.

## Ejemplo 2

*Reactividad cruzada antigénica de hialuronidasa de veneno de abeja de miel y de avispon*

Se inmunizaron ratones de cepa BALB/c bisemanalmente por ruta intraperitoneal con hialuronidasas naturales de veneno de avispon o de abeja en presencia de alum como coadyuvante. Se inmunizaron grupos de cuatro ratones en las semanas 0, 2, 4 y 6 con 0,2 ml de hialuronidasa 10 mg/ml y alum de 5 mg/ml en tampón fosfato 0,05 M, pH 6,2.

Se obtuvieron bazo de ratones inmunizados para ensayos de proliferación de linfocitos. Los ensayos de proliferación en la semana 3, después de dos inmunizaciones, mostraron que las células de bazo de ratones inmunizados con hialuronidasa de avispon respondieron igualmente bien a la estimulación con proteína de avispon o de abeja, y que las células de bazo de ratones inmunizados con proteína de abeja respondieron fuertemente a la estimulación con proteína de abeja pero débilmente a la estimulación con proteína de avispon (Fig. 8A y B). Se obtuvieron resultados muy similares cuando se utilizó hialuronidasa de avispon de pintas amarillas (*V. Vulgaris*) o abispa (*P. annularis*) en lugar de proteína de avispon como antígeno estimulador en estos ensayos. Estos descubrimientos sugieren reacción cruzada antigénica de los epítomos de células T de abeja y hialuronidasas de vespídos.

Las respuestas a largo plazo a la inmunización fueron también estudiadas. En la semana 9, las células de bazo de ratones inmunizados con hialuronidasa de avispon demostraron una respuesta alterada *in vitro*, con un grado significativamente mayor de proliferación como respuesta a la hialuronidasa de avispon en comparación con la hialuronidasa de abeja. Se observó que la magnitud de la respuesta de las células de bazo a la hialuronidasa de avispon aumentaba de la semana 3 a la semana 9, mientras que la magnitud de la respuesta a la hialuronidasa de abeja siguió siendo aproximadamente la misma (Figura 9A).

Las células de bazo de ratones inmunizados con hialuronidasa de abeja continuaron proliferando *in vitro* cuando se estimularon con hialuronidasa de abeja, pero respondieron de manera poco satisfactoria cuando se estimularon con hialuronidasa de avispon (Figura 9B).

Las respuestas de anticuerpos de los ratones fueron también evaluadas. Se obtuvieron sueros en las semanas 0, 5, 7 y se ensayaron en cuanto a anticuerpos mediante EMSA en pocillos de microtitulación recubiertos con hialuronidasa de abeja o de avispon. Los resultados del ensayo ELISA se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

35

| CONCENTRACIONES DE ANTICUERPO DE RATONES BALB/c INMUNIZADOS CON HIALURONIDASA DE VENENO DE AVISPÓN O ABEJA |                         |                   |              |                   |                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------|--------------|-------------------|-------------------|
| CONCENTRACIÓN Ab                                                                                           |                         |                   |              |                   |                   |
| SUELOS ESPECÍFICOS DE HIALURONIDASA                                                                        | ABEJA                   |                   | AVISPÓN      |                   |                   |
|                                                                                                            | SUELOS DE HIALURONIDASA |                   | -ESPECÍFICOS |                   |                   |
|                                                                                                            | SEMANA                  | ABEJA HYA         | AVISPÓN HYA  | ABEJA HYA         | AVISPÓN HYA       |
|                                                                                                            | 0                       | <10               |              |                   | <10               |
|                                                                                                            | 5                       | 1x10 <sup>4</sup> | <10          | 10                | 1X10 <sup>4</sup> |
|                                                                                                            | 7                       | 4X10 <sup>4</sup> | <10          | 2X10 <sup>2</sup> | 5X10 <sup>4</sup> |
|                                                                                                            | 9                       | 2X10 <sup>4</sup> | 10           | 2X10 <sup>2</sup> | 6X10 <sup>4</sup> |

40

45

50

Los sueros recogidos en la semana 7 y 9 mostraron que los anticuerpos específicos de hialuronidasa de veneno de avispon reaccionaron fuertemente con ellos mismos y semanalmente con la hialuronidasa del veneno. Los anticuerpos específicos de hialuronidasa de veneno de abeja reaccionaron solamente con el inmunógeno.

El conocimiento de la reactividad cruzada antigénica de estas dos proteínas de veneno es de interés clínico, puesto que es sabido que existe una asociación entre la sensibilidad a vespídos y abejas en pacientes.

## Ejemplo 3

*Expresión de hialuronidasa de veneno de avispon funcional*

El clon 12 en el vector pCR de la Tabla 3 contiene el inserto de DNAC que codifica el residuo 1-331 de hialuronidasa de avispon. El inserto de DNAC está flanqueado por lugares de restricción BamHI y Bg/II en los extremos de limitación 5' y 3', respectivamente. El inserto fue cortado del vector por digestión BamHI y Bg/II, e insertado en el plásmido pQE12 con lugares cohesivos complementarios (QIAGEN, Chatsworth, CA). La mutación en la posición de nucleótido 199 en el clon 12 (A→T), que resulta en la introducción de fenilalanina por isoleucina (ver nota de la Tabla 3), eliminó de forma fortuita un lugar Bg/II en la región de codificación de la hialuronidasa.

El plásmido pQE12 recombinante fue utilizado para transformar bacterias competentes M15 (pREP). En la inducción de la bacteria transformada con isopropiltiogalactosidasa, se expresaron dos proteínas recombinantes de unos 43 y 26 kD. Ambas proteínas eran reactivas con anticuerpos específicos para hialuronidasa de avispon mediante transferencia Western. Los anticuerpos utilizados en la transferencia Western fueron obtenidos a partir del sangrado de la semana 9 de los ratones BALB/c, tal como se describe en el anterior Ejemplo 4.

El plásmido pQE12 es diseñado de manera que la proteína recombinante tiene la secuencia: MRGS-inserto-SRH<sub>6</sub>. La presencia de la secuencia de hexa-histidina en la proteína recombinante hace posible su purificación de otras proteínas bacterianas por cromatografía de quelatado de iones metálicos seguida de cromatografía de fase inversa.

La proteína recombinante purificada no presentaba actividad de hialuronidasa. El repliegue de la proteína recombinante en 5mM 2-mercaptoetanol, 1mM EDTA y clorohidrato de guanidina 2 M en tampón 0,05 M Tris-HCl de pH 7,4 proporciona un producto que tenía aproximadamente 50% de la actividad específica de la hialuronidasa natural. La cantidad de hialuronidasa recombinante purificada fue calculada por absorbancia UV. Dado que la muestra purificada contenía proteínas de 23 kD y de 46 kD, la actividad enzimática real de la enzima recombinante funcional puede ser superior al 50% de la hialuronidasa nativa.

Los experimentos anteriores soportan fuertemente la tesis de que la proteína recombinante de 43 kD es la hialuronidasa de avispon. La proteína recombinante de 26 kD puede producirse debido al inicio de traducción 3' al lugar deseado. Estos estados internos pueden producirse donde exista una secuencia de consenso de unión de ribosoma (secuencia Shine-Dalgarno) 5' a un codón interno ATG o GUG.

#### *Depósito de microorganismos*

Una cepa bacteriana INF $\alpha$ F' que contiene un plásmido recombinante pCR que tiene ácidos nucleicos que codifican fosfolipasa de avispon de cara blanca, designada WFH-PLA, ha sido depositada el 11 de Marzo de 1993 en el American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, bajo las previsiones del Tratado de Budapest sobre Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con Objetivos de Procesos de Patentes, y ha recibido el número de acceso ATCC 69254.

La presente invención no está limitada en su alcance a los microorganismos depositados o a las realizaciones específicas que se han descrito, puesto que dichas realizaciones están destinadas solamente a efectos ilustrativos de un aspecto de la invención, y cualesquiera microorganismos que sean funcionalmente equivalentes se encuentran dentro del ámbito de la presente invención. Realmente, diferentes modificaciones de la invención, además de las que se han mostrado y descrito, quedarán evidentes en los técnicos en la materia a partir de la descripción realizada y de los dibujos que la acompañan. Estas modificaciones están destinadas a quedar comprendidas dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

También se comprenderá que todos los pares de bases, dimensiones de los nucleótidos son aproximadas y se utilizan con objetivos descriptivos.

Se citan varias referencias que se incorporan a la descripción actual de modo completo.

# REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico aislado que codifica una hialuronidasa de veneno de vespido o un derivado de la misma, **carac-**  
**terizado** porque dicho ácido nucleico aislado hibrida bajo condiciones de elevada restricción un ácido nucleico que  
 codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO:57.

2. Ácido nucleico aislado, según la reivindicación 1, en el que la hialuronidasa de veneno de vespido procede de  
 un vespido del género *Dolichovespula*.

3. Ácido nucleico aislado, según la reivindicación 2, en el que la hialuronidasa de veneno de vespido procede de  
 la especie maculata y tiene la secuencia de aminoácido mostrada en SEQ ID NO: 55.

4. Ácido nucleico aislado, según la reivindicación 3, que tiene la secuencia de codificación mostrada en SEQ ID  
 NO: 54.

5. Ácido nucleico aislado, según la reivindicación 1, en el que la hialuronidasa de veneno de vespido procede del  
 género *Vespula*.

6. Ácido nucleico aislado, según la reivindicación 5, en el que la hialuronidasa de veneno de vespido procede de  
 la especie *Vulgaris*.

7. Ácido nucleico aislado, según la reivindicación 1, que es hibridable en condiciones de alta restricción a un ácido  
 nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 54.

8. Ácido nucleico aislado que codifica una hialuronidasa de veneno de vespido seleccionado del grupo en que  
 consiste en

a) SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 47,  
 SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53;

b) un ácido nucleico amplificado utilizando pares complementarios de los fragmentos anteriores como ceba-  
 dores en síntesis de nucleótidos por reacción de cadena de polimerasa;

c) ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID  
 NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50; SEQ ID NO:52; y

d) ácido nucleico que codifica un fragmento terminal C de 26 kilo dalton de hialuronidasa de veneno de  
 vespido de la especie *Dolichovespula maculata*.

9. Ácido nucleico aislado que codifica una hialurodidasa de veneno de vespido que es hibridable en condiciones de  
 alta restricción a un ácido nucleico que tiene cualquiera de las secuencias de nucleótidos indicadas en la reivindicación  
 8.

10. Polipéptido codificado por el ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el poli-  
 péptido es una proteína de fusión de enzima de veneno de vespido que comprende un polipéptido inmunomodulador  
 de una enzima de hialuronidasa de veneno de vespido y una parte funcionalmente activa de una proteína de enzima de  
 veneno no vespido.

11. Proteína de fusión, según la reivindicación 10, en la que la parte funcionalmente activa de una proteína de  
 enzima de veneno de no vespido es una secuencia de polihistidina.

12. Polipéptido, según la reivindicación 10, en el que la hialuronidasa de veneno de vespido tiene una secuencia  
 de aminoácido tal como se ha indicado en SEQ ID NO: 57.

13. Polipéptido, según la reivindicación 12, con una modificación seleccionada entre el grupo que consiste en un  
 ácido aspártico para una asparagina en el n° de residuos 31 en SEQ ID NO: 57 y una fenilalamina para una isoleucina  
 en el residuo n° 47 en SEQ ID NO: 57.

14. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, operacio-  
 nalmente asociadas a un promotor.

15. Método para la producción de un polipéptido codificado por un ácido nucleico, según cualquiera de las reivin-  
 dicaciones 1 a 9, que comprende:

## ES 2 278 379 T3

- a) cultivo de una célula transformada con el vector de expresión de la reivindicación 14, de manera que un polipéptido codificado por el ácido nucleico es expresado por la célula; y
- b) recuperar el polipéptido expresado de este modo del cultivo.

16. Método, según la reivindicación 15, en el que la célula es una célula bacteriana o una ligadura.

17. Compuesto que comprende el polipéptido de la reivindicación 10, y un portador farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de un estado específico de alérgeno de veneno de vespido.

18. Método para la preparación de un compuesto farmacéutico que comprende la obtención de un polipéptido utilizando el método de la reivindicación 15 y mezclando el péptido con un portador farmacéuticamente aceptable.

19. Utilización del polipéptido de la reivindicación 10, o compuesto farmacéutico según la reivindicación 17, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un estado alérgico específico de alérgeno de veneno de vespido.

20. Compuesto que comprende una enzima de veneno de vespido recombinante seleccionada de un polipéptido codificada por un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o el polipéptido de fusión de la reivindicación 10, células que contienen un vector recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica la encima de veneno de vespido y un medio celular.

21. Compuesto farmacéutico que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, y un portador farmacéuticamente aceptable.

FIG. 1A

Y I Y H H R \* H L P P N F S R S N C E K 60  
 TATATATACACCGATGACATCTCCGCCTAACTTTTCCAGATCGAATTGCGAAAA  
  
S E R P K R V F N I Y W N V P T F M C H 20  
 TCCGAGAGACCGAAAGAGTCTTCAACATTATTGGAACGTTCTACCTTATGTGTCAT 120  
  
Q Y G L Y F D E V T N F N I K H N S K D 40  
 CAGTATGGCCCTATACCTTCGACGAGGTACAAATTTTAATNAGCATAAATCTAAGGAC 180  
  
D F O G D K I S I F Y D P G E F P A L L 60  
 GATTCCAGGGTGACAGATCTCAATTTTATGATCTGGAGAAATCCCGGCATTGTTG 240  
  
 P L K E G N Y K I R N G G V P Q E G N I 80  
 CCGCTCAAAGAGCCATTATAAGATAAGAAACGGAGGAGTCTCAAGNAGGTAACATA 300  
  
 T I H L Q R F I E N L D K T Y P N R N P 100  
 ACGATACATCTCCAAAGATTATCGAAATTTGGATAAAACATATCCAAATAGGAACCTC 360  
  
 N G I G V I D F E R W R P I F R Q N W G 120  
 AACGGTATCGGTGTGATCGACTTTGAAAGATGGAGACCGATCTTCCGACAAATTTGGGC 420  
  
 N M M I H K K F S I D L V R N E H P F W 140  
 AATATGATGATTCTAAGAAGTTTTCATAGACCTAGTTGCGCAATGAACATCCATTCTGG 480  
  
 D K K M I E L E A S K R F E K Y A R L F 160  
 GATAAAAGATCATCGAATTGCGAGCCATCTAAGAGGTTTGAATAATATGCCAGACTTTC 540

FIG. 1B

M E E T L K L A K K T R K Q A D W G Y Y 180  
 ATGGAGGNAACCTTTGAAATGGCCAAAGACTAGGAGCGCCGATGGGGCTATTAC 500  
  
 G Y P Y C F N M S P N N L V P D C D A T 200  
 GGATATCCCTACTGTGTTTAATATGTGCGCTAATATCTCGTACCAGATGTGACGCTACA 660  
  
 A M L E N D K H S W L F N N Q N V L L P 220  
 GCGATGCTCGAGACGACAAGTGTGCTGCTGTTCAATATCAAAATGTACTTCTACCA 720  
  
 S V Y I R H E L T P D Q R V G L V Q G R 240  
 TCCGTCTATATTAGACACGAACTGACCCCTGATCAAGAGTTGGTTAGTCCAAAGAGA 780  
  
 V K E A V R I S N N L K H S P K V L S Y 260  
 GTGAAGGAAGCTGTTAGGATATCGAATATTTAAACATTCACCGAAGTGCTCTCTTAT 840  
  
 W W Y V Y Q D D T N T F L T E T D V K X 280  
 TGGTCGTACGTGTATCAGGAGATCAAAACACTTTTCTTACCGAGACCGACGTGAAGAAG 900  
  
 T F Q E I A I N G G D G I I I W G S S S 300  
 ACTTTCCAAAGAGATAGCGATTAAACGGTGGGATGGTATCATATTATATGGGGTAGCTGCTCC 960  
  
 D V N S L S K C K R L R E Y L L T V L G 320  
 GACGTAAACAGCTTAAGTAATGTATAGAGATTACGGGAGTATCTGTTGACGGTTTGGGA 1020  
  
 P I T V N V T E T V N \* 331  
 CCAATCAGGTTAACGTGACGGAAACCGTCAACTAAAGATTATCCCTAAACTTTTAGTAC 1080  
  
 AATCTATGTAACTCTTGGCGATGGCGATAGGTGTGTTCAATGATCTGCTTTCCGAAACG 1140  
  
 TATCGATGCTGCAACGATGATCTCGGACAAATGCCATCACATTTGAAGAAGACTTTTCGCA 1200  
  
 GGAAGGAAAAAATAAAAAAAAAA 1229

|         |                   |                   |                       |    |
|---------|-------------------|-------------------|-----------------------|----|
| abeja   | PDNNKTVREFNVYWNVP | TFMCHKYGLRFE      | EVSEKYGILQNWMDKFRGEEI | 50 |
| avispon | SERPKRVFNIYWNVP   | TFMCHQYGLYFDEV    | TN-FNFKHNSKODFQGDKI   | 47 |
| cobaya  | APPLIPNVPLLWVNNA  | PTEPCIGGTNQPLDMSE | -FSIVGTPRKNITQSI      | 52 |

|         |                                                                                                     |           |           |           |           |     |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----|
|         | . . . . .                                                                                           | . . . . . | . . . . . | . . . . . | . . . . . | .   |
| abeja   | A I L Y D P G M F P A L L K D P N - G N V V A R N G G V P Q L G N L T K H L Q V F R D H L I N Q I P |           |           |           |           | 99  |
| avispon | S I F Y D P G E F P A L L P L K E - G N Y K I R N G G V P Q E G N I T I H L Q R F I E N L D K T Y P |           |           |           |           | 96  |
| cobaya  | T L Y Y V D R L G Y Y P Y I D P H T G A I V -- H G G L P Q L M N L Q Q H L R K S R O D I L F Y M P  |           |           |           |           | 100 |
|         | .                                                                                                   | .         | .         | .         | .         | .   |

abeja  
avispon  
cobaya

[illegible][illegible]

|         |                               |                            |     |
|---------|-------------------------------|----------------------------|-----|
| abeja   | ALRIARQMTTSRKKVL PYYWK---     | YQDRD T LSRADLEATLRKITD LG | 293 |
| avispon | AVRISNNLKHSP-KVLSYWWTV---     | YQDDTNTFLTETDVKKTFQEIA ING | 289 |
| cobaya  | SIRVSKLMDD--KNPLPIVYIRLVFTDQT | TTTFLDLDLVHVSVEIVPLG       | 297 |

[illegible]

FIG. 3A

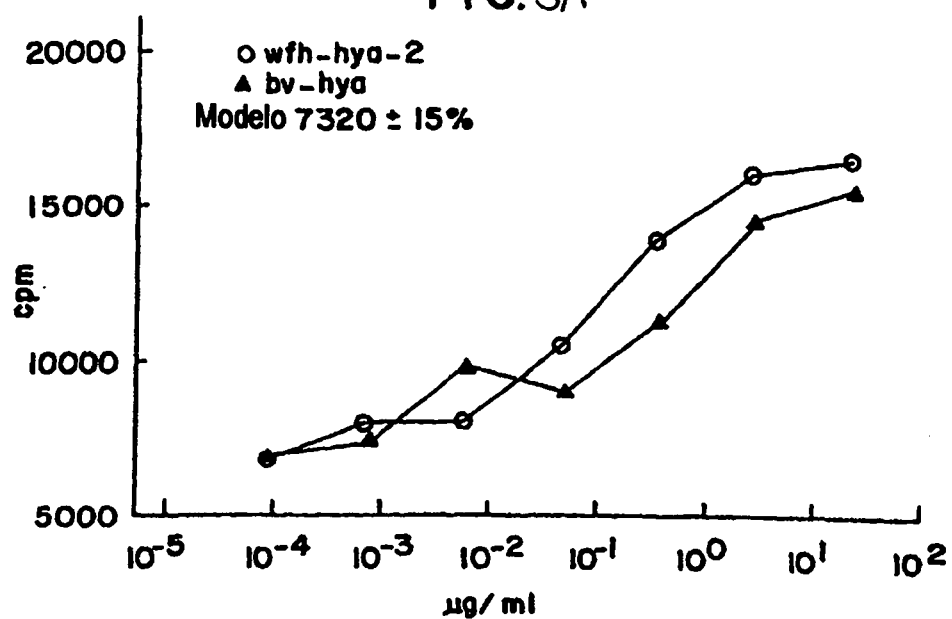


FIG. 3B

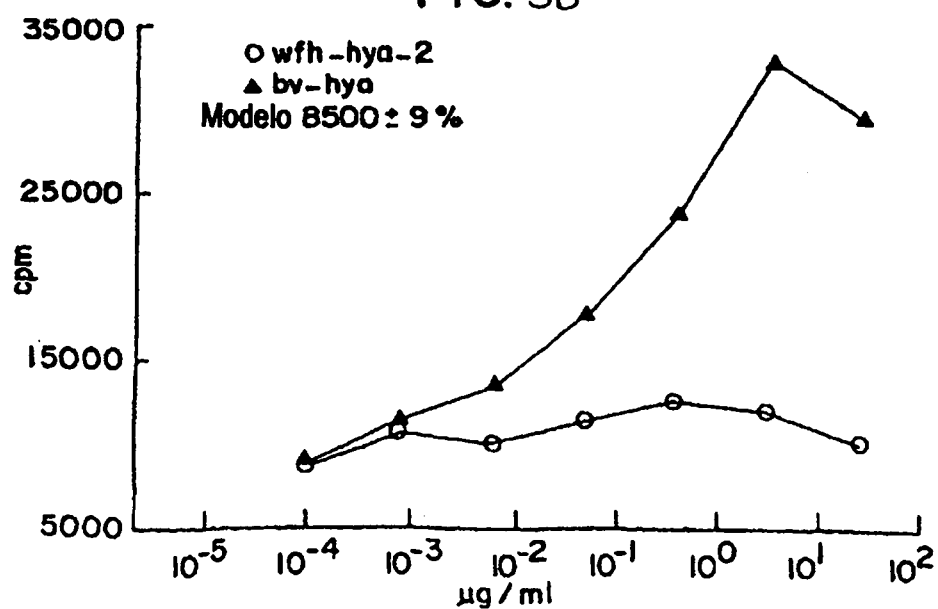


FIG. 4A

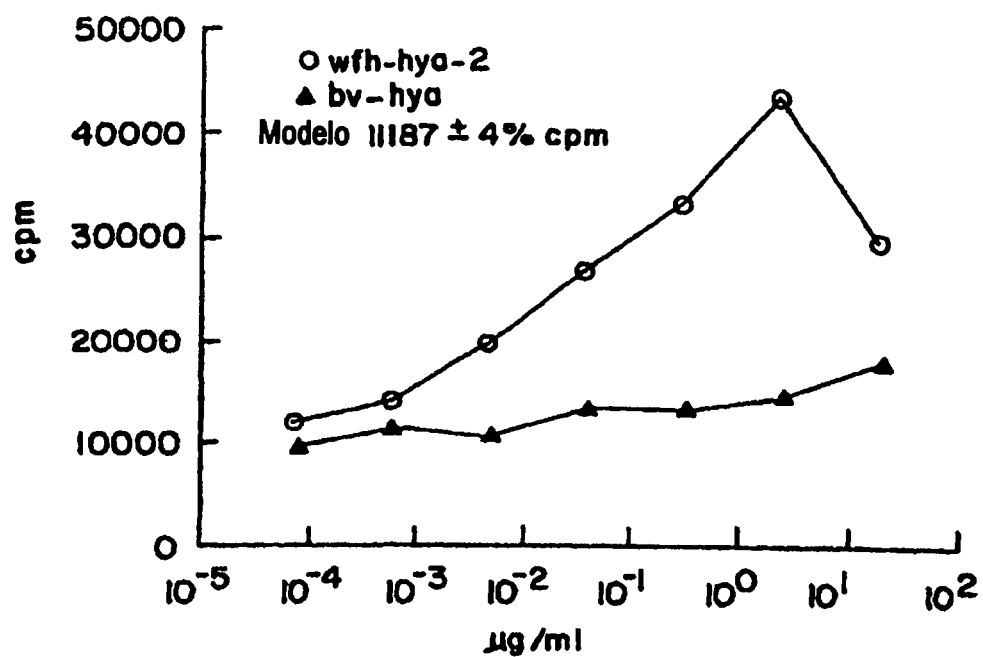
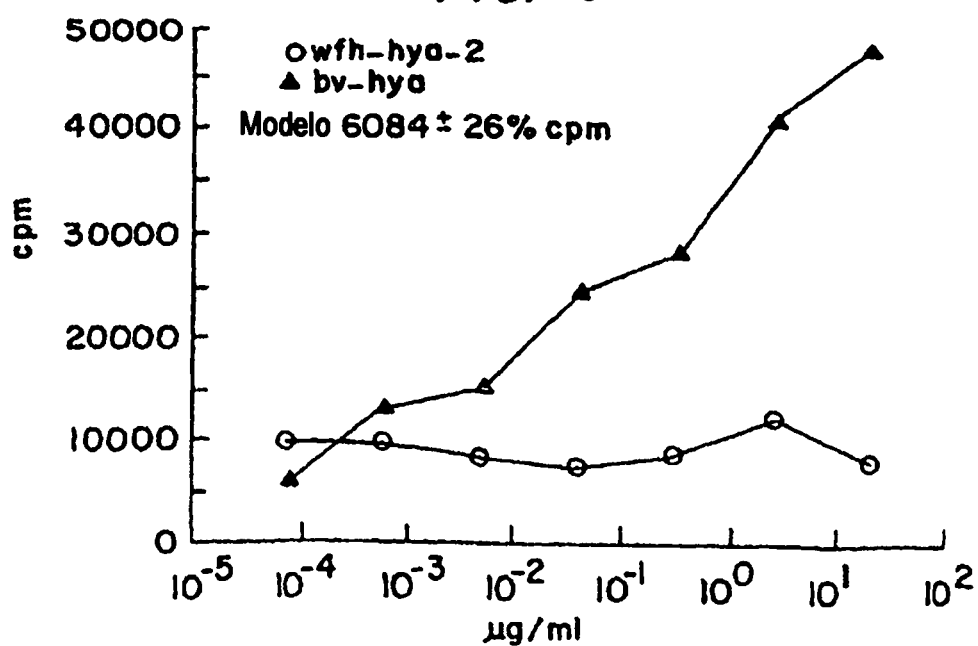


FIG. 4B



**LISTA DE SECUENCIAS**

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: King, Te-Piao
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: CLONADO Y PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE ENZIMAS DE VENENO DE VÉSPIDOS, TALES COMO FOSFOLIPASA Y HIALURONIDASA, Y TERAPIAS INMUNOLÓGICAS BASADAS EN LAS MISMAS
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 62
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) NOMBRE: Klauber & Jackson
- 15 (B) CALLE: 411 Hackensack Avenue
- (C) CIUDAD: Hackensack
- (D) ESTADO: Nueva Jersey
- 20 (E) PAÍS: U.S.A.
- (F) ZIP: 07601
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 25 (A) TIPO MEDIO: Disco flexible
- (B) ORDENADOR: compatible PC IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25
- 30 (vi) DATOS SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: WO no asignada todavía
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 10-MARZO-1994
- 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/180.209
- 40 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 11-ENERO-1994
- (vii) DATOS SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/031.400
- 45 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 11-MARZO-1993
- (viii) INFORMACIÓN DE REPRESENTANTE/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Jackson Esq., David A.
- 50 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 26.742
- (C) NÚMERO DE EXPENDIENTE/REFERENCIA: 600-1-074 PCT
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- 55 (A) TELÉFONO: 201 487-5800
- (B) TELEFAX: 201 343-1684
- (C) TÉLEX: 133521
- 60 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 43 pares de bases
- 65 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

## ES 2 278 379 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAc

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

5 AAGGATCCGT CGACATCGAT AATACGACTC ACTATAGGGA TTT

43

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: eDNA

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

AAGGATCCGT CGACATC

17

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

GACATCGATA ATACGAC

17

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

45 (B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

55 Asp Thr Val Lys Met Ile  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

65 (C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

## ES 2 278 379 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

GAYACNGTMA ARATGAT

17

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

20

Lys His Asp Tyr Thr  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

30

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

35

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

AARCAYGAYT TYTAYAC

17

40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

45

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

50

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

Ile Gln Val His Ala Asp  
1 5

55

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60

(A) LONGITUD: 20 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

65

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

## ES 2 278 379 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

ATYTGNACRT AATGNGCRTC

20

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

20

Pro Tyr Glu Thr Cys  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:11:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

30

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

35

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:11:

GGRTAYTCRT CNGTRCA

17

40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

45

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:12:

55

Met Leu Ala Glu Ser  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60

(A) LONGITUD: 17 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

65

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

## ES 2 278 379 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

GCATAAGAGC CTCTGAC

17

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:14:

20

Met Thr Asp Leu Thr  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:15:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

30

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

35

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:15:

TCATTGTATC TAGCGTA

17

40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1050 pares de base

45

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAc

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: COS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..951

55

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:16:

60

65

# ES 2 278 379 T3

|    |                                                                 |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|
|    | AGA TTA ATA ATG TTC GTA GGT GAT CCG TCG TCA TCA AAT GAA TTA GAT | 48  |
|    | Arg Leu Ile Met Phe Val Gly Asp Pro Ser Ser Ser Asn Glu Leu Asp |     |
| 5  | 1 5 10 15                                                       |     |
|    | AGA TTC TCC GTA TGT CCC TTT AGT AAT GAT ACA GTT AAG ATG ATT TTT | 96  |
|    | Arg Phe Ser Val Cys Pro Phe Ser Asn Asp Thr Val Lys Met Ile Phe |     |
| 10 | 20 25 30                                                        |     |
|    | TTA ACA AGG GAA AAC CGA AAA CAT GAT TTT TAT ACG CTA GAT ACA ATG | 144 |
|    | Leu Thr Arg Glu Asn Arg Lys His Asp Phe Tyr Thr Leu Asp Thr Met |     |
| 15 | 35 40 45                                                        |     |
|    | AAC AGG CAC AAT GAA TTT AAG AAG TCA ATC ATA AAA CGT CCA GTT GTA | 192 |
|    | Asn Arg His Asn Glu Phe Lys Lys Ser Ile Ile Lys Arg Pro Val Val |     |
| 20 | 50 55 60                                                        |     |
|    | TTC ATT ACG CAT GGT TTT ACT TCG TCT GCA ACC GAA AAA AAT TTC GTT | 240 |
|    | Phe Ile Thr His Gly Phe Thr Ser Ser Ala Thr Glu Lys Asn Phe Val |     |
| 25 | 65 70 75 80                                                     |     |
|    | GCT ATG TCA GAG GCT CTT ATG CAT ACA GGT GAT TTT CTT ATA ATT ATG | 288 |
|    | Ala Met Ser Glu Ala Leu Met His Thr Gly Asp Phe Leu Ile Ile Met |     |
| 30 | 85 90 95                                                        |     |
|    | GTC GAT TGG CCG ATG GCT GCT TGT ACT GAT GAA TAC CCA GGT CTG AAG | 336 |
|    | Val Asp Trp Arg Met Ala Ala Cys Thr Asp Glu Tyr Pro Gly Leu Lys |     |
| 35 |                                                                 |     |
| 40 |                                                                 |     |
| 45 |                                                                 |     |
| 50 |                                                                 |     |
| 55 |                                                                 |     |
| 60 |                                                                 |     |
| 65 |                                                                 |     |

# ES 2 278 379 T3

|    | 100                                                             | 105 | 110 |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 5  | TAT ATG TTT TAT AAG GCT GCC GTT GGT AAT ACA CGC TTA GTT GGA AAT |     |     | 384 |
|    | Tyr Met Phe Tyr Lys Ala Ala Val Gly Asn Thr Arg Leu Val Gly Asn |     |     |     |
|    | 115                                                             | 120 | 125 |     |
| 10 | TTT ATC GCT ATG ATC GCA AAG AAA CTT GTA GAA CAA TAT AAA GTG CCG |     |     | 432 |
|    | Phe Ile Ala Met Ile Ala Lys Lys Leu Val Glu Gln Tyr Lys Val Pro |     |     |     |
|    | 130                                                             | 135 | 140 |     |
| 15 | ATG ACA AAT ATA CGA CTG GTG GGA CAC AGT TTG GGC GCA CAC ATT TCA |     |     | 480 |
|    | Met Thr Asn Ile Arg Leu Val Gly His Ser Leu Gly Ala His Ile Ser |     |     |     |
| 20 | 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
|    | GGT TTC GCA GGC AAA AGA GTT CAA GAG TTA AAA TTA GGA AAA TTT TCT |     |     | 528 |
| 25 | Gly Phe Ala Gly Lys Arg Val Gln Glu Leu Lys Leu Gly Lys Phe Ser |     |     |     |
|    | 165                                                             | 170 | 175 |     |
|    | GAA ATT ATT GGG CTT GAT CCT GCT GGG CCT AGT TTC AAG AAA AAT GAT |     |     | 576 |
| 30 | Glu Ile Ile Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro Ser Phe Lys Lys Asn Asp |     |     |     |
|    | 180                                                             | 185 | 190 |     |
| 35 | TGT TCC GAG AGA ATC TGC GAG ACA GAC GCA CAT TAT GTA CAA ATT TTA |     |     | 624 |
|    | Cys Ser Glu Arg Ile Cys Glu Thr Asp Ala His Tyr Val Gln Ile Leu |     |     |     |
|    | 195                                                             | 200 | 205 |     |
| 40 | CAT ACA TCG AGC AAT TTA GGA ACA GAG AGA ACT CTT GGC ACC GTC GAT |     |     | 672 |
|    | His Thr Ser Ser Asn Leu Gly Thr Glu Arg Thr Leu Gly Thr Val Asp |     |     |     |
|    | 210                                                             | 215 | 220 |     |
| 45 | TTC TAC ATA AAT AAC GGA AGT AAT CAA CCC GGT TGC AGA TAT ATT ATT |     |     | 720 |
|    | Phe Tyr Ile Asn Asn Gly Ser Asn Gln Pro Gly Cys Arg Tyr Ile Ile |     |     |     |
|    | 225                                                             | 230 | 235 | 240 |

# ES 2 278 379 T3

|    |                                                                                                                                                   |      |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 5  | GGA GAA ACT TGC TCT CAT ACG AGA GCC GTG AAA TAC TTT ACC GAG TGC<br>Gly Glu Thr Cys Ser His Thr Arg Ala Val Lys Tyr Phe Thr Glu Cys<br>245 250 255 | 768  |
| 10 | ATA AGA CGC GAA TGT TGT TTA ATT GGG GTC CCG CAG TCC AAG AAT CCG<br>Ile Arg Arg Glu Cys Cys Leu Ile Gly Val Pro Glu Ser Lys Asn Pro<br>260 265 270 | 816  |
| 15 | CAG CCT GTT TCG AAG TGC ACA AGA AAC GAG TGC GTT TGC GTT GGA TTA<br>Gln Pro Val Ser Lys Cys Thr Arg Asn Glu Cys Val Cys Val Gly Leu<br>275 280 285 | 864  |
| 20 | AAC GCA AAG AAA TAT CCT AAA AGG GGC TCA TTT TAT GTA CCG GTT GAA<br>Asn Ala Lys Lys Tyr Pro Lys Arg Gly Ser Phe Tyr Val Pro Val Glu<br>290 295 300 | 912  |
| 25 | GCT GAA GCT CCA TAT TGC AAT AAC AAC GGG AAA ATA ATT TAATTATATA<br>Ala Glu Ala Pro Tyr Cys Asn Asn Asn Gly Lys Ile Ile<br>305 310 315              | 961  |
| 30 | AAAAAACAT TACTATTGAC ACAAGTGCAT TTGTAAATGA TGAATGAAT AAATTACGAT                                                                                   | 1021 |
| 35 | TCACGATAAA AAAAAAAX AAAAAAAX                                                                                                                      | 1050 |

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:17:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 317 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - 45 (D) TOPOLOGÍA: lineal
  - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
  - (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:17:

50

55

60

65

# ES 2 278 379 T3

Arg Leu Ile Met Phe Val Gly Asp Pro Ser Ser Ser Asn Glu Leu Asp  
1 5 10 15

Arg Phe Ser Val Cys Pro Phe Ser Asn Asp Thr Val Lys Met Ile Phe  
20 25 30

Leu Thr Arg Glu Asn Arg Lys His Asp Phe Tyr Thr Leu Asp Thr Met  
35 40 45

Asn Arg His Asn Glu Phe Lys Lys Ser Ile Ile Lys Arg Pro Val Val  
50 55 60

Phe Ile Thr His Gly Phe Thr Ser Ser Ala Thr Glu Lys Asn Phe Val  
65 70 75 80

Ala Met Ser Glu Ala Leu Met His Thr Gly Asp Phe Leu Ile Ile Met  
85 90 95

Val Asp Trp Arg Met Ala Ala Cys Thr Asp Glu Tyr Pro Gly Leu Lys  
100 105 110

Tyr Met Phe Tyr Lys Ala Ala Val Gly Asn Thr Arg Leu Val Gly Asn  
115 120 125

Phe Ile Ala Met Ile Ala Lys Lys Leu Val Glu Gln Tyr Lys Val Pro  
130 135 140

Met Thr Asn Ile Arg Leu Val Gly His Ser Leu Gly Ala His Ile Ser  
145 150 155 160

Gly Phe Ala Gly Lys Arg Val Gln Glu Leu Lys Leu Gly Lys Phe Ser  
165 170 175

# ES 2 278 379 T3

Glu Ile Ile Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro Ser Phe Lys Lys Asn Asp  
 180 185 190  
 Cys Ser Glu Arg Ile Cys Glu Thr Asp Ala His Tyr Val Gln Ile Leu  
 195 200 205  
 His Thr Ser Ser Asn Leu Gly Thr Glu Arg Thr Leu Gly Thr Val Asp  
 210 215 220  
 Phe Tyr Ile Asn Asn Gly Ser Asn Gln Pro Gly Cys Arg Tyr Ile Ile  
 225 230 235 240  
 Gly Glu Thr Cys Ser His Thr Arg Ala Val Lys Tyr Phe Thr Glu Cys  
 245 250 255  
 Ile Arg Arg Glu Cys Cys Leu Ile Gly Val Pro Gln Ser Lys Asn Pro  
 260 265 270  
 Gln Pro Val Ser Lys Cys Thr Arg Asn Glu Cys Val Cys Val Gly Leu  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Lys Tyr Pro Lys Arg Gly Ser Phe Tyr Val Pro Val Glu  
 290 295 300  
 Ala Glu Ala Pro Tyr Cys Asn Asn Asn Gly Lys Ile Ile  
 305 310 315

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:18:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 123 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:18:

# ES 2 278 379 T3

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

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:19:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 123 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:19:

# ES 2 278 379 T3

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

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:20:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 125 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:20:

# ES 2 278 379 T3

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

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:21:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 124 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:21:

## ES 2 278 379 T3

**Tyr Thr Gln Ala Ser Tyr Asn Thr Arg Val Leu Gly Ala Glu Ile Ala**  
**1 5 10 15**  
**Phe Leu Val Gln Val Leu Ser Thr Glu Met Gly Tyr Ser Pro Glu Asn**  
**20 25 30**  
**Val His Leu Ile Pro His Ser Leu Gly Ser His Val Ala Gly Glu Ala**  
**35 40 45**  
**Gly Arg Arg Leu Glu Gly His Val Gly Arg Ile Thr Gly Leu Asp Pro**  
**50 55 60**  
**Ala Glu Pro Cys Phe Gln Gly Leu Pro Glu Glu Val Arg Leu Asp Pro**  
**65 70 75 80**  
**Ser Asp Ala Met Phe Val Asp Val Ile His Thr Asp Ser Ala Pro Ile**  
**85 90 95**  
**Ile Pro Tyr Leu Gly Phe Gly Met Ser Gln Lys Val Gly His Leu Asp**  
**100 105 110**  
**Phe Phe Pro Asn Gly Gly Lys Glu Ile Pro Gly Cys**  
**115 120**

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:22:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 121 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:22:

## ES 2 278 379 T3

**Tyr Lys Ala Ala Val Gly Asn Thr Arg Leu Val Gly Asn Phe Ile Ala**  
**1 5 10 15**

**Met Ile Ala Lys Lys Leu Val Glu Gln Tyr Lys Val Pro Met Thr Asn**  
**20 25 30**

**Ile Arg Leu Val Gly His Ser Leu Gly Ala His Ile Ser Gly Phe Ala**  
**35 40 45**

**Gly Lys Arg Val Gln Glu Leu Lys Leu Gly Lys Phe Ser Glu Ile Ile**  
**50 55 60**

**Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro Ser Phe Lys Lys Asn Asp Cys Ser Glu**  
**65 70 75 80**

**Arg Ile Cys Glu Thr Asp Ala His Tyr Val Gln Ile Leu His Thr Ser**  
**85 90 95**

**Ser Asn Leu Gly Thr Glu Arg Thr Leu Gly Thr Val Asp Phe Tyr Ile**  
**100 105 110**

**Asn Asn Gly Ser Asn Gln Pro Gly Cys**  
**115 120**

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:23:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:23:

**Val Asn Arg His Asn Gln Phe Arg**  
**1 5**

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:24:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

## ES 2 278 379 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:24:

Leu Lys Arg His Asn Asp Phe Arg  
1 5

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

15

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:25:

20

Met Asn Arg His Asn Glu Phe Lys  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:26:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1341 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

30

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

35

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 153..1052

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:26:

ATTTCGGGT AGTTTGTTT ACGTCTCTAC ACAAAACAAA AATCATGGAA GAAATATGA 60

45

ATTAAAGTA TTTATTATTA TTCGTGTATT TTGTGCAAGT GTTAAATTGT TGCTATGGAC 120

ATGGTGATCC GTTATCTTAC GAATTAGATA GA GGA CCC AAA TGT CCT TTT AAT 173

50

Gly Pro Lys Cys Pro Phe Asn

1

5

TCT GAT ACA GTT TCG ATA ATT ATT GAA ACA AGG GAA AAC CGA AAT CGT 221

55

Ser Asp Thr Val Ser Ile Ile Ile Glu Thr Arg Glu Asn Arg Asn Arg

10

15

20

GAT CTT TAT ACA CTA CAG ACA TTA CAG AAT CAT CCT GAA TTT AAG AAA 269

60

Asp Leu Tyr Thr Leu Gln Thr Leu Gln Asn His Pro Glu Phe Lys Lys

25

30

35

65

# ES 2 278 379 T3

|    |                                                                                                                                                       |     |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5  | AAA ACT ATA ACA CGT CCA GTT GTA TTC ATT ACA CAT GGT TTT ACT TCA<br>Lys Thr Ile Thr Arg Pro Val Val Phe Ile Thr His Gly Phe Thr Ser<br>40 45 50 55     | 317 |
| 10 | TCT GCA AGT GAA ACA AAT TTC ATA AAT TTA GCA AAA GCT TTG GTA GAT<br>Ser Ala Ser Glu Thr Asn Phe Ile Asn Leu Ala Lys Ala Leu Val Asp<br>60 65 70        | 365 |
| 15 | AAA GAT AAG TAT ATG GTT ATC TCA ATC GAT TGG CAG ACG GCT GCT TGT<br>Lys Asp Asn Tyr Met Val Ile Ser Ile Asp Trp Gln Thr Ala Ala Cys<br>75 80 85        | 413 |
| 20 | ACT AAT GAA GCT GCA GGT TTA AAG TAT TTA TAT TAT CCT ACT GCT GCT<br>Thr Asn Glu Ala Ala Gly Leu Lys Tyr Leu Tyr Tyr Pro Thr Ala Ala<br>90 95 100       | 461 |
| 25 | AGA AAT ACA CGT TTA GTT GGA CAA TAT ATC GCT ACG ATT ACC CAG AAA<br>Arg Asn Thr Arg Leu Val Gly Gln Tyr Ile Ala Thr Ile Thr Gln Lys<br>105 110 115     | 509 |
| 30 | CTC GTA AAA CAC TAT AAA ATC TCG ATG GCA AAT ATA CGA TTA ATT GGA<br>Leu Val Lys His Tyr Lys Ile Ser Met Ala Asn Ile Arg Leu Ile Gly<br>120 125 130 135 | 557 |
| 35 | CAT AGC TTA GGA GCA CAT GCT TCA GGT TTT GCA GGC AAA AAG GTT CAA<br>His Ser Leu Gly Ala His Ala Ser Gly Phe Ala Gly Lys Lys Val Gln<br>140 145 150     | 605 |
| 40 | GAG TTA AAA TTA GGA AAA TAT TCT GAA ATT ATT GGG CTT GAT CCT GCT<br>Glu Leu Lys Leu Gly Lys Tyr Ser Glu Ile Ile Gly Leu Asp Pro Ala<br>155 160 165     | 653 |
| 45 | AGG CCT TCG TTC GAT TCA AAT CAT TGT TCC GAA AGA CTC TGC GAG ACA<br>Arg Pro Ser Phe Asp Ser Asn His Cys Ser Glu Arg Leu Cys Glu Thr<br>170 175 180 185 | 701 |

# ES 2 278 379 T3

|    | 170                                                               | 175 | 180 |      |
|----|-------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| 5  | GAT GCA GAA TAT GTT CAA ATT ATA CAT ACA TCA AAC TAT TTA GGA ACC   |     |     | 749  |
|    | Asp Ala Glu Tyr Val Gln Ile Ile His Thr Ser Asn Tyr Leu Gly Thr   |     |     |      |
|    | 185                                                               | 190 | 195 |      |
| 10 | GAA AAA ACC CTT GGT ACC GTC GAT TTC TAC ATG AAT AAC GGA AAG AAT   |     |     | 797  |
|    | Glu Lys Thr Leu Gly Thr Val Asp Phe Tyr Met Asn Asn Gly Lys Asn   |     |     |      |
|    | 200                                                               | 205 | 210 | 215  |
| 15 | CAA CCT GGT TGC GGT AGA TTT TTC TCA GAA GTT TGC TCT CAT TCG AGA   |     |     | 845  |
|    | Gln Pro Gly Cys Gly Arg Phe Phe Ser Glu Val Cys Ser His Ser Arg   |     |     |      |
|    | 220                                                               | 225 | 230 |      |
| 20 | GCC GTG ATA TAC ATG GCT GAG TGC ATA AAA CAC GAA TGT TGT TTA ATT   |     |     | 893  |
|    | Ala Val Ile Tyr Met Ala Glu Cys Ile Lys His Glu Cys Cys Leu Ile   |     |     |      |
|    | 235                                                               | 240 | 245 |      |
| 25 | GGG ATA CCG AAG TCA AAG AGT TCG CAG CCT ATT TCG TCG TGC ACA AAA   |     |     | 941  |
|    | Gly Ile Pro Lys Ser Lys Ser Ser Gln Pro Ile Ser Ser Cys Thr Lys   |     |     |      |
|    | 250                                                               | 255 | 260 |      |
| 30 | CAG GAG TGC GTT TGC GTT GGA TTA AAC GCA AAG AAG TAT ACT AGT AGA   |     |     | 989  |
|    | Gln Glu Cys Val Cys Val Gly Leu Asn Ala Lys Lys Tyr Thr Ser Arg   |     |     |      |
|    | 265                                                               | 270 | 275 |      |
| 35 | GGC TCA TTT TAT GTA CCG GTT GAA AGT ACT GTT CCT TTT TGC AAT AAC   |     |     | 1037 |
|    | Gly Ser Phe Tyr Val Pro Val Glu Ser Thr Val Pro Phe Cys Asn Asn   |     |     |      |
|    | 280                                                               | 285 | 290 | 295  |
| 40 | AAG GGG AAG ATA ATT TAATAATATA AAAAAGTAAT TTCCATTGAT CGAAATGCAT   |     |     | 1092 |
|    | Lys Gly Lys Ile Ile                                               |     |     |      |
|    | 300                                                               |     |     |      |
| 45 | TTGTTAATGG TGAATGAATA AATTACCATT TAACAAATAA TCGTACATGC AGAATGTCGT |     |     | 1152 |
|    |                                                                   |     |     |      |
| 50 | CCAAATAAT TCGGAGTAT ATAATGGATG ATCTTAGCAA ATTTAAAAA TAAAAAGAAT    |     |     | 1212 |
|    |                                                                   |     |     |      |
|    | TATATAACA TATACCTAT TTGATTTGCT TTTTAGTTG TAGTGAATTG AATTTTCTG     |     |     | 1272 |
|    |                                                                   |     |     |      |
| 55 | TCTGCTTAAT TTGAACTGC TTCCTTGCTT CTGAATAAAT GCCTGTAAAC ATAAAAAAA   |     |     | 1332 |
|    |                                                                   |     |     |      |
|    | AAAAAAAA                                                          |     |     | 1341 |

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:27:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 300 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - 65 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

# ES 2 278 379 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:27:

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

## ES 2 278 379 T3

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Pro Ile Ser Ser Cys Thr Lys Gln Glu Cys Val Cys Val Gly Leu Asn |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
|                                                                 |     |     |
| Ala Lys Lys Tyr Thr Ser Arg Gly Ser Phe Tyr Val Pro Val Glu Ser |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
|                                                                 |     |     |
| Thr Val Pro Phe Cys Asn Asn Lys Gly Lys Ile Ile                 |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:28:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - 20 (C) CADENA: única
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
  - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
  - 25 (iii) HIPOTÉTICA: NO
  - (iv) ANTISENTIDO: NO
  - (v) TIPO FRAGMENTO: interno
  - 30 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:28:
- Phe Asn Tle Tyr Trp Asn  
1 5

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:29:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 26 pares de base
  - 40 (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) CADENA: única
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
  - 45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC
  - (iii) HIPOTÉTICA: NO
  - (iv) ANTISENTIDO: NO
  - 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:29:

CGTGGATCCT CCAAYATNTA YTGGA

26

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:30:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
  - 60 (B) TIPO: aminoácido
  - (C) CADENA: única
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
  - 65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
  - (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO FRAGMENTO: interno

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:30:

Asp Gly Gin Phe Asp Asp  
1 5

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de base

15 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: SI

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:31:

CTRCTRAARG TYCCNCTTCT AGATGC

26

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

35 (B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

45 (v) TIPO FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:32:

50 Trp Asn Val Pro Thr Phe Met  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:33:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

60 (C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

(iii) HIPOTÉTICA: NO

65 (iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:33:

TGGAACGTTC CTACCTTTAT G

21

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:34:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - 10 (C) CADENA: única
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
  - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
  - 15 (iii) HIPOTÉTICA: NO
  - (iv) ANTISENTIDO: NO
  - (v) TIPO FRAGMENTO: interno
  - 20 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:34:
- Gly Leu Tyr Phe Asp Glu  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:35:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 18 pares de base
  - 30 (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) CADENA: única
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
  - 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC
  - (iii) HIPOTÉTICA: NO
  - (iv) ANTISENTIDO: NO
  - 40 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:35:

GGCCTATACT TCGACGAG

18

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:36:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
  - 50 (B) TIPO: aminoácido
  - (C) CADENA: única
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
  - 55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
  - (iii) HIPOTÉTICA: NO
  - (iv) ANTISENTIDO: NO
  - 60 (v) TIPO FRAGMENTO: interno
  - (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:36:
- Tyr Gly Tyr Gly Trp  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 18 pares de base  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: única  
10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

(iii) HIPOTÉTICA: NO

15 (iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:37:

CCCCGATAAT GCCTATAG

18

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 6 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) CADENA: única  
30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

35 (iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:38:

40 Asp Ile Val Gly Ile Gly  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 18 pares de base  
(B) TIPO: ácido nucleico  
50 (C) CADENA: única  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

55 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:39:

60 GCCATAGCCA CACTAGCT

18

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 65 (A) LONGITUD: 6 aminoácidos

## ES 2 278 379 T3

- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
  - (iii) HIPOTÉTICA: NO
  - (iv) ANTISENTIDO: NO
  - (v) TIPO FRAGMENTO: interno
  - (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:40:
- Leu Pro Leu Leu Ala Pro  
1 5

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:41:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 18 pares de base
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) CADENA: única
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: SI
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:41:

GGGCCGTAA CAACGGCGA

18

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:42:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 27 pares de base
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) CADENA: única
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: SI
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:42:

AGCATAATAG CTACAGCTGC CTAGGAA

27

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:43:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 16 pares de base
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) CADENA: única
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

(iii) HIPOTÉTICA: NO

5 (iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:43:

TTTAGGGATA TCACTC

10

16

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:44:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15

(A) LONGITUD: 17 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

20

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

(iii) HIPOTÉTICA: NO

25

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:44:

CTACAGCTGC CTAGGAA

30

17

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35

(A) LONGITUD: 17 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

40

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

(iii) HIPOTÉTICA: NO

45

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:45:

CAGCATAATA GCTACAG

50

17

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:46:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

60

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

65

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO FRAGMENTO: interno

## ES 2 278 379 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:46:

Ser Glu Arg Pro Lys Arg  
1 5

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:47:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 24 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

15

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

(iii) HIPOTÉTICA: NO

20

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:47:

CGTGGATCCG AGAGACCGAA AAGA

25

24

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:48:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

35

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

40

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:48:

45

Asn Val Thr Glu Thr Val  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:49:

50

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

55

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

60

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:49:

65

CACTGCCTTT GGCAGTTGTC TAGATGC

27

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:50:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única
- 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

15 (iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:50:

20 Ile Asp Pho Glu Arg Trp  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:51:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 30 (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

35 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:51:

40 ATCGACTTTG AAAGATGG

18

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:52:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- 50 (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

55 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO FRAGMENTO: interno

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:52:

Met Glu Thr Leu Lys  
1 5

65 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:53:

## ES 2 278 379 T3

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 26 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:53:

CGTGGATCCA TGGAGGAAAC TTTGAA

26

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:54:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1229 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 61 1056

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:54:

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| TATATATATC ACCACCGATG ACATCTCCCG CCTAACTTTT CCAGATCGAA TTGCGAAAAA | 60  |
| TCC GAG AGA CCG AAA AGA GTC TTC AAC ATT TAT TGG AAC GTT CCT ACC   | 108 |
| Ser Glu Arg Pro Lys Arg Val Phe Asn Ile Tyr Trp Asn Val Pro Thr:  |     |
| 1 5 10 15                                                         |     |
| TTT ATG TGT CAT CAG TAT GGC CTA TAC TTC GAC GAG GTT ACA AAT TTT   | 156 |
| Phe Met Cys His Gln Tyr Gly Leu Tyr Phe Asp Glu Val Thr Asn Phe   |     |
| 20 25 30                                                          |     |
| AAT ATA AAG CAT AAT TCT AAG GAC GAT TTC CAG GGT GAC AAG ATC TCA   | 204 |
| Asn Ile Lys His Asn Ser Lys Asp Asp Phe Gln Gly Asp Lys Ile Ser   |     |
| 35 40 45                                                          |     |
| ATT TTT TAT GAT CTT GGA GAA TTC CCG GCA TTG TTG CCG CTC AAA GAA   | 252 |
| Ile Phe Tyr Asp Pro Gly Glu Phe Pro Ala Leu Leu Pro Leu Lys Glu   |     |
| 50 55 60                                                          |     |
| GGC AAT TAT AAG ATA AGA AAC GGA GGA GTT CCT CAA GAA GGT AAC ATA   | 300 |
| Gly Asn Tyr Lys Ile Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Glu Gly Asn Ile   |     |
| 65 70 75 80                                                       |     |
| ACG ATA CAT CTC CAA AGA TTT ATC GAA AAT TTG GAT AAA ACA TAT CCA   | 348 |
| Thr Ile His Leu Gln Arg Phe Ile Glu Asn Leu Asp Lys Thr Tyr Pro   |     |

# ES 2 278 379 T3

|    | 85                                                              | 90  | 95  |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 5  | AAT AGG AAC TTC AAC GGT ATC GGT GTG ATC GAC TTT GAA AGA TGG AGA |     |     | 396 |
|    | Asn Arg Asn Phe Asn Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Arg Trp Arg |     |     |     |
|    | 100                                                             | 105 | 110 |     |
| 10 | CCG ATC TTC CGA CAA AAT TGG GGC AAT ATG ATG ATT CAT AAG AAG TTT |     |     | 444 |
|    | Pro Ile Phe Arg Gln Asn Trp Gly Asn Met Met Ile His Lys Lys Phe |     |     |     |
|    | 115                                                             | 120 | 125 |     |
| 15 | TCA ATA GAC CTA GTT CGC AAT GAA CAT CCA TTC TGG GAT AAA AAG ATG |     |     | 492 |
|    | Ser Ile Asp Leu Val Arg Asn Glu His Pro Phe Trp Asp Lys Lys Met |     |     |     |
| 20 | 130                                                             | 135 | 140 |     |
| 25 | ATC GAA TTG GAG GCA TCT AAG AGG TTT GAA AAA TAT GCC AGA CTT TTC |     |     | 540 |
|    | Ile Glu Leu Glu Ala Ser Lys Arg Phe Glu Lys Tyr Ala Arg Leu Phe |     |     |     |
|    | 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| 30 | ATG GAG GAA ACT TTG AAA TTG GCC AAA AAG ACT AGG AAG CAG GCC GAT |     |     | 588 |
|    | Met Glu Glu Thr Leu Lys Leu Ala Lys Lys Thr Arg Lys Gln Ala Asp |     |     |     |
|    | 165                                                             | 170 | 175 |     |
| 35 | TGG GGC TAT TAC GGA TAT CCC TAC TGT TTT AAT ATG TCG CCT AAT AAT |     |     | 636 |
|    | Trp Gly Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Cys Phe Asn Met Ser Pro Asn Asn |     |     |     |
|    | 180                                                             | 185 | 190 |     |
| 40 | CTC GTA CCC GAT TGT GAC GCT ACA GCG ATG CTC GAG AAC GAC AAG ATG |     |     | 684 |
|    | Leu Val Pro Asp Cys Asp Ala Thr Ala Met Leu Glu Asn Asp Lys Met |     |     |     |
|    | 195                                                             | 200 | 205 |     |
| 45 | TCG TGG CTG TTC AAT AAT CAA AAT GTA CTT CTA CCA TCC GTC TAT ATT |     |     | 732 |
|    | Ser Trp Leu Phe Asn Asn Gln Asn Val Leu Leu Pro Ser Val Tyr Ile |     |     |     |
|    | 210                                                             | 215 | 220 |     |

# ES 2 278 379 T3

|    |                                                                   |      |
|----|-------------------------------------------------------------------|------|
| 5  | AGA CAC GAA CTG ACC CCT GAT CAA AGA GTT GGT TTA GTC CAA GGA AGA   | 780  |
|    | Arg His Glu Leu Thr Pro Asp Gln Arg Val Gly Leu Val Gln Gly Arg   |      |
|    | 225 230 235 240                                                   |      |
| 10 | GTG AAG GAA GCT GTT AGG ATA TCG AAT AAT TTA AAA CAT TCA CCG AAA   | 828  |
|    | Val Lys Glu Ala Val Arg Ile Ser Asn Asn Leu Lys His Ser Pro Lys   |      |
|    | 245 250 255                                                       |      |
| 15 | GTG CTC TCT TAT TGG TGG TAC GTG TAT CAG GAC GAT ACA AAC ACT TTT   | 876  |
|    | Val Leu Ser Tyr Trp Trp Tyr Val Tyr Gln Asp Asp Thr Asn Thr Phe   |      |
|    | 260 265 270                                                       |      |
| 20 | CTT ACC GAG ACC GAC GTG AAA AAG ACT TTC CAA GAG ATA GCG ATT AAC   | 924  |
|    | Leu Thr Glu Thr Asp Val Lys Lys Thr Phe Gln Glu Ile Ala Ile Asn   |      |
|    | 275 280 285                                                       |      |
| 25 | GGT GGG GAT GGT ATC ATT ATA TGG GGT AGC TCG TCC GAC GTA AAC AGC   | 972  |
|    | Gly Gly Asp Gly Ile Ile Ile Trp Gly Ser Ser Ser Asp Val Asn Ser   |      |
|    | 290 295 300                                                       |      |
| 30 | TTA AGT AAA TGT AAG AGA TTA CGG GAG TAT CTG TTG ACG GTT TTG GGA   | 1020 |
|    | Leu Ser Lys Cys Lys Arg Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Thr Val Leu Gly   |      |
|    | 305 310 315 320                                                   |      |
| 35 | CCA ATC ACG GTT AAC GTG ACG GAA ACC GTC AAC TAAAGATTAT CCCTAAACTT | 1073 |
|    | Pro Ile Thr Val Asn Val Thr Glu Thr Val Asn                       |      |
|    | 325 330                                                           |      |
| 40 | TTAGTACNAT CTATGTAACC TCTTGCCGAT GGCATAGGT GTGTTCAATG ATCTGCTTTG  | 1133 |
| 45 | CGAACGCTAT CGATGCTGCA ACGATGAATA CTGCGACAAT GCCATCACAT TGAAAAGACT | 1193 |
| 50 | TTTCGCAGGA AGGAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA                           | 1229 |

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:55:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 331 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:55:

# ES 2 278 379 T3

Ser Glu Arg Pro Lys Arg Val Phe Asn Ile Tyr Trp Asn Val Pro Thr  
1 5 10 15

Phe Met Cys His Gln Tyr Gly Leu Tyr Phe Asp Glu Val Thr Asn Phe  
20 25 30

Asn Ile Lys His Asn Ser Lys Asp Asp Phe Gln Gly Asp Lys Ile Ser  
35 40 45

Ile Phe Tyr Asp Pro Gly Glu Phe Pro Ala Leu Leu Pro Leu Lys Glu  
50 55 60

Gly Asn Tyr Lys Ile Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Glu Gly Asn Ile  
65 70 75 80

Thr Ile His Leu Gln Arg Phe Ile Glu Asn Leu Asp Lys Thr Tyr Pro  
85 90 95

Asn Arg Asn Phe Asn Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Arg Trp Arg  
100 105 110

Pro Ile Phe Arg Gln Asn Trp Gly Asn Met Met Ile His Lys Lys Phe

# ES 2 278 379 T3

|    | 115                                                             | 120 | 125     |
|----|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 5  | Ser Ile Asp Leu Val Arg Asn Glu His Pro Phe Trp Asp Lys Lys Met |     |         |
|    | 130                                                             | 135 | 140     |
| 10 | Ile Glu Leu Glu Ala Ser Lys Arg Phe Glu Lys Tyr Ala Arg Leu Phe |     |         |
|    | 145                                                             | 150 | 155 160 |
| 15 | Met Glu Glu Thr Leu Lys Leu Ala Lys Lys Thr Arg Lys Gln Ala Asp |     |         |
|    | 165                                                             | 170 | 175     |
| 20 | Trp Gly Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Cys Phe Asn Met Ser Pro Asn Asn |     |         |
|    | 180                                                             | 185 | 190     |
| 25 | Leu Val Pro Asp Cys Asp Ala Thr Ala Met Leu Glu Asn Asp Lys Met |     |         |
|    | 195                                                             | 200 | 205     |
| 30 | Ser Trp Leu Phe Asn Asn Gln Asn Val Leu Leu Pro Ser Val Tyr Ile |     |         |
|    | 210                                                             | 215 | 220     |
| 35 | Arg His Glu Leu Thr Pro Asp Gln Arg Val Gly Leu Val Gln Gly Arg |     |         |
|    | 225                                                             | 230 | 235 240 |
| 40 | Val Lys Glu Ala Val Arg Ile Ser Asn Asn Leu Lys His Ser Pro Lys |     |         |
|    | 245                                                             | 250 | 255     |
| 45 | Val Leu Ser Tyr Trp Trp Tyr Val Tyr Gln Asp Asp Thr Asn Thr Phe |     |         |
|    | 260                                                             | 265 | 270     |
| 50 | Leu Thr Glu Thr Asp Val Lys Lys Thr Phe Gln Glu Ile Ala Ile Asn |     |         |
|    | 275                                                             | 280 | 285     |
| 55 | Gly Gly Asp Gly Ile Ile Ile Trp Gly Ser Ser Ser Asp Val Asn Ser |     |         |
|    | 290                                                             | 295 | 300     |
| 60 | Leu Ser Lys Cys Lys Arg Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Thr Val Leu Gly |     |         |
|    | 305                                                             | 310 | 315 320 |
| 65 | Pro Ile Thr Val Asn Val Thr Glu Thr Val Asn                     |     |         |
|    | 325                                                             | 330 |         |

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:56:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 343 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única

# ES 2 278 379 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:56:

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

## ES 2 278 379 T3

Val Tyr Leu Arg Trp Asn Leu Thr Ser Gly Glu Arg Val Gly Leu Val  
225 230 235 240

Gly Gly Arg Val Lys Glu Ala Leu Arg Ile Ala Arg Gln Met Thr Thr  
245 250 255

Ser Arg Lys Lys Val Leu Pro Tyr Tyr Trp Tyr Lys Tyr Gln Asp Arg  
260 265 270

Arg Asp Thr Asp Leu Ser Arg Ala Asp Leu Glu Ala Thr Leu Arg Lys  
275 280 285

Ile Thr Asp Leu Gly Ala Asp Gly Phe Ile Ile Trp Gly Ser Ser Asp  
290 295 300

Asp Ile Asn Thr Lys Ala Lys Cys Leu Gln Phe Arg Glu Tyr Leu Asn  
305 310 315 320

Asn Glu Leu Gly Pro Ala Val Lys Arg Ile Ala Leu Asn Asn Asn Ala  
325 330 335

Asn Asp Arg Leu Thr Val Asp  
340

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:57:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 331 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:57:

# ES 2 278 379 T3

Ser Glu Arg Pro Lys Arg Val Phe Asn Ile Tyr Trp Asn Val Pro Thr  
1 5 10 15

Phe Met Cys His Gln Tyr Gly Leu Tyr Phe Asp Glu Val Thr Asn Phe  
20 25 30

Asn Ile Lys His Asn Ser Lys Asp Asp Phe Gln Gly Asp Lys Ile Ser  
35 40 45

Ile Phe Tyr Asp Pro Gly Glu Phe Pro Ala Leu Leu Pro Leu Lys Glu  
50 55 60

Gly Asn Tyr Lys Ile Arg Asn Gly Gly Val Pro Gln Glu Gly Asn Ile  
65 70 75 80

Thr Ile His Leu Gln Arg Phe Ile Glu Asn Leu Asp Lys Thr Tyr Pro  
85 90 95

Asn Arg Asn Phe Asn Gly Ile Gly Val Ile Asp Phe Glu Arg Trp Arg  
100 105 110

Pro Ile Phe Arg Gln Asn Trp Gly Asn Met Met Ile His Lys Lys Phe  
115 120 125

Ser Ile Asp Leu Val Arg Asn Glu His Pro Phe Trp Asp Lys Lys Met

# ES 2 278 379 T3

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

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:58:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 344 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - 65 (C) CADENA: única
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

# ES 2 278 379 T3

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:58:

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

Ala Phe Pro Leu Ile Pro Asn Val Pro Leu Leu Trp Val Trp Asn Ala
1           5           10           15

Pro Thr Glu Pro Cys Ile Gly Gly Thr Asn Gln Pro Leu Asp Met Ser
          20           25           30

Phe Phe Ser Ile Val Gly Thr Pro Arg Lys Asn Ile Thr Gly Gln Ser
          35           40           45

Ile Thr Leu Tyr Tyr Val Asp Arg Leu Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp
          50           55           60

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

Leu Gln Gln His Leu Arg Lys Ser Arg Gln Asp Ile Leu Phe Tyr Met
          85           90           95

Pro Thr Asp Ser Val Gly Leu Ala Val Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg
          100          105          110

Pro Thr Trp Tyr Arg Asn Trp Arg Pro Lys Asp Ile Tyr Arg Asn Lys
          115          120          125

Ser Ile Glu Leu Val Lys Ser Gln His Pro Gln Tyr Asn His Ser Tyr
          130          135          140

Ala Val Ala Val Ala Lys Arg Asp Phe Glu Arg Thr Gly Lys Ala Phe
145          150          155          160

Met Leu Glu Thr Leu Lys Leu Gly Lys Ser Leu Arg Pro Ser Ser Leu
          165          170          175

Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys Tyr Asn Thr His Phe Thr Lys
          180          185          190

Pro Asn Tyr Asp Gly His Cys Pro Pro Ile Glu Leu Gln Arg Asn Asn
          195          200          205

Asp Leu Gln Trp Leu Trp Asn Asp Ser Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Val
          210          215          220

Tyr Leu Thr Ser Arg Val Arg Ser Ser Gln Asn Gly Ala Leu Tyr Val
225          230          235          240

Arg Asn Arg Val His Glu Ser Ile Arg Val Ser Lys Leu Met Asp Asp

```

## ES 2 278 379 T3

|    | 245                                                 | 250                         | 255 |
|----|-----------------------------------------------------|-----------------------------|-----|
| 5  | Lys Asn Pro Leu Pro Ile Tyr Val Tyr                 | Ile Arg Leu Val Phe Thr Asp |     |
|    | 260                                                 | 265                         | 270 |
| 10 | Gln Thr Thr Thr Phe Leu Glu Leu Asp Asp             | Leu Val His Ser Val Gly     |     |
|    | 275                                                 | 280                         | 285 |
| 15 | Glu Ile Val Pro Leu Gly Val Ser Gly Ile Ile Ile     | Trp Gly Ser Leu             |     |
|    | 290                                                 | 295                         | 300 |
| 20 | Ser Leu Thr Arg Ser Leu Val Ser Cys Ile Gly Leu Glu | Asn Tyr Met                 |     |
|    | 305                                                 | 310                         | 315 |
| 25 | Lys Gly Thr Leu Leu Pro Tyr Leu Ile Asn Val Thr Leu | Ala Ala Lys                 |     |
|    | 325                                                 | 330                         | 335 |
| 30 | Met Cys Gly Gln Val Leu Cys Lys                     |                             |     |
|    | 340                                                 |                             |     |

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:59:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

#### (iii) HIPOTÉTICA: NO

#### (iv) ANTISENTIDO: NO

#### (v) TIPO FRAGMENTO: interno

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:59:

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Phe Ser Val Cys Pro Phe |   |
| 1                       | 5 |

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:60:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 27 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

#### (iii) HIPOTÉTICA: NO

#### (iv) ANTISENTIDO: NO

## ES 2 278 379 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:60:

CGTGGATCCT TCTCCGATATG TCCCTTT

21

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:61:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

20

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:61:

25

Ile Ile Lys Gly Asn Asn  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:62:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de base

(B) TIPO: ácido nucleico

35

(C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNAC

40

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:62:

45

CGTAGATCTA ATTATTTTCC CGTTGTT

21

50

55

60

65