



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 063**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)	C07H 21/00 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)	C07H 21/04 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)	C07K 4/00 (2006.01)
C07K 5/00 (2006.01)	C07K 2/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)	C07K 16/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)	C12N 1/14 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)	C12N 1/18 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)	C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)	C12N 5/04 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 9/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)	C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)	C12N 15/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02802957 .7**

96 Fecha de presentación : **22.02.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1377305**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2004**

54 Título: **Polipéptidos derivados de la triptofanil ARNt sintetasa útiles para la regulación de la angiogénesis.**

30 Prioridad: **23.02.2001 US 270951 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE**
10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, California 92037, US

72 Inventor/es: **Schimmel, Paul;**
Wakasugi, Keisuke y
Friedlander, Martin

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Polipéptidos derivados de la triptofanil ARNt sintetasa útiles para la regulación de la angiogénesis.

5 **Reivindicación de prioridad**

La presente solicitud reivindica prioridad para la solicitud provisional de Estados Unidos para la patente nº de serie 60/270.951 presentada el 23 de febrero de 2001.

10 **Derechos gubernamentales**

La presente invención fue realizada con la ayuda gubernamental de los Institutos Nacionales de la Salud del Gobierno de los Estados Unidos, beca GM23562; el Gobierno de los Estados Unidos posee determinados derechos en la invención.

15 **Campo de la invención**

La invención se refiere a polipéptidos truncados de ARNt sintetasa, a los ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos, a las células hospedadoras que incluyen dichos ácidos nucleicos o que expresan dichos polipéptidos, a las composiciones y kits que comprenden dichos polipéptidos, así como a la utilización de dichos polipéptidos para la preparación de composiciones farmacéuticas.

Antecedentes de la invención

25 Las aminoacil-ARNt sintetetas, que catalizan la aminoacilación de moléculas de ARNt, son proteínas antiguas que son esenciales para descodificar la información genética durante el proceso de traducción. En los eucariotas superiores, nueve aminoacil-ARNt sintetetas se asocian por lo menos con otros tres polipéptidos para formar un complejo polienzimático supramolecular (Mirande *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 147:281-89 (1985)). Cada una de las ARNt sintetetas eucarióticas está constituida por una enzima con núcleo, que está íntimamente relacionada con la contrapartida pro-
30 cariótica de la ARNt sintetasa, y un dominio adicional que está anexo al extremo del terminal amino o del terminal carboxi de la enzima del núcleo (Mirande, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 40:95-142 (1991)).

En la mayoría de los casos, los dominios añadidos parece que contribuyen al montaje del complejo polienzimático. Sin embargo, la presencia de un dominio más no se correlaciona estrictamente con la asociación de una sintetasa en el
35 complejo polienzimático.

Las moléculas TrpRS de mamífero tienen un dominio amino-terminal añadido. En las células humanas normales, pueden detectarse dos formas de TrpRS: una forma mayor constituida por la molécula completa (restos de aminoácidos 1-471 de la SEC. ID. nº: 1) y una forma truncada menor ("mini TrpRS"; restos de aminoácidos 1-424 de SEC. ID. nº: 3). La forma menor se genera por eliminación del dominio amino-terminal por corte y empalme alternativo del pre-ARNm (Tolstrup *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:397-403 (1995)). Se ha determinado que el terminal amino de mino-TrpRS es el resto "met" en la posición 48 de la molécula completa de TrpRS (*id.*). Alternativamente, la TrpRS truncada puede generarse por proteólisis (Lemaire *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 51:237-52 (1975)). Por ejemplo, la TrpRS bovina se expresa mucho en el páncreas y se segrega en el jugo pancreático (Kisselev, *Biochimie* 75:1027-39 (1993)), dando
45 como resultado de este modo la producción de una molécula truncada de TrpRS. Estos resultados sugieren que la TrpRS truncada puede tener una función distinta de la aminoacilación del ARNt (*id.*).

La angiogénesis, o proliferación de nuevos capilares a partir de los vasos sanguíneos preexistentes, es un proceso fundamental necesario para el desarrollo del embrión, el desarrollo posterior y la reparación de tejidos. La angiogénesis es un requisito previo para el desarrollo y la diferenciación del árbol vascular, así como para una amplia variedad de procesos fisiológicos fundamentales incluyendo la embriogénesis, el desarrollo somático, la reparación y regeneración de tejidos y órganos, el desarrollo cíclico del cuerpo lúteo y del endometrio y el desarrollo y diferenciación del sistema nervioso. En el sistema reproductor femenino, la angiogénesis se produce en el folículo durante su desarrollo, en el cuerpo lúteo después de la ovulación y en la placenta para establecer y mantener el embarazo. La angiogénesis además se produce como parte de los procesos de reparación del cuerpo, p. ej., en la cicatrización de heridas y fracturas. La angiogénesis es también un factor en el desarrollo del tumor, ya que un tumor debe estimular continuamente el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos capilares con objeto de desarrollarse. La angiogénesis es una parte esencial del desarrollo del cáncer sólido humano, y la angiogénesis anormal está asociada a otras enfermedades tales como la artritis reumatoide, la psoriasis y la retinopatía diabética (Folkman, J. y Klagbrun, M., *Science* 235:442-447 (1987)).

60 Varios factores están implicados en la angiogénesis, p. ej., las moléculas ácidas y básicas del factor de crecimiento de fibroblastos que son ambas mitógenas para las células endoteliales y otros tipos de células. La angiotropina y la angiogenina pueden producir angiogénesis, aunque sus funciones son anucleares (Folkman, J., *Cancer Medicine*, págs. 153-170, Lea y Febiger Press (1993)). Un mitógeno muy selectivo para las células endoteliales vasculares es el factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF (Ferrara, N., *et al.*, *Endocr. Rev.* 13:19-32 (1992)).

65 La inmensa mayoría de enfermedades que producen la pérdida catastrófica de la visión actúan como resultado de la neovascularización ocular; la degeneración macular relacionada con la edad (ARMD) afecta a 12 a 15 millones de

americanos de más de 65 años de edad y produce pérdida de la vista en el 10 al 15% de ellos como efecto directo de la neovascularización de la coroides (subretiniana). La causa principal de la pérdida de visión por los americanos con menos de 65 años de edad es la diabetes; 16 millones de individuos en los Estados Unidos son diabéticos y 40.000 al año padecen complicaciones oculares de la enfermedad, con frecuencia como resultado de la neovascularización de la retina. Aunque la fotocoagulación con láser ha sido eficaz para prevenir la pérdida grave de la vista en subgrupos de pacientes diabéticos con alto riesgo, la frecuencia global de 10 años de la retinopatía permanece sustancialmente inalterada. Para los pacientes con neovascularización de la coroides debida a la ARMD o a la enfermedad ocular inflamatoria tal como la histoplasmosis ocular, la fotocoagulación, con pocas excepciones, es ineficaz para prevenir la pérdida de la vista. Aunque desarrolladas recientemente, las terapias fotodinámicas no destructivas son prometedoras para reducir temporalmente la pérdida individual en pacientes con neovascularización de la coroides previamente intratable, solamente el 61,4% de los pacientes tratados cada 3 a 4 meses han mejorado o estabilizado la visión en comparación con el 45,9% del grupo tratado con placebo.

En el adulto normal, la angiogénesis está estrechamente regulada, y está limitada a cicatrización de heridas, embarazo y al ciclo uterino. La angiogénesis es producida por moléculas angiogénicas específicas tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) básico y ácido, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la angiogenina, el factor de crecimiento transformante (TGF), el factor- α de la necrosis tumoral (TNF- α) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). La angiogénesis puede ser suprimida por moléculas inhibitorias tales como el interferón α , la trombospondina-1, la angiostatina y la endostatina. Es el equilibrio de estos estimulantes naturales y de los inhibidores el que controla el sistema vascular capilar normalmente en reposo. Cuando este equilibrio está alterado, como en determinados estados patológicos, las células endoteliales capilares son inducidas a proliferar, migrar y por último diferenciarse.

La angiogénesis desempeña una función central en varias enfermedades incluyendo el cáncer y la neovascularización ocular. Se ha demostrado también que el desarrollo mantenido y la metástasis de varios tumores depende del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos del hospedador en el tumor en respuesta a factores angiogénicos derivados del tumor. La proliferación de nuevos vasos sanguíneos en respuesta a varios estímulos se produce como el descubrimiento dominante en la mayoría de las enfermedades oculares incluyendo la retinopatía diabética proliferante (PDR), ARMD, glaucoma rubeótico, queratitis intersticial y retinopatía prematura. En estas enfermedades, el daño del tejido puede estimular la liberación de factores angiogénicos dando como resultado la proliferación celular. VEGF desempeña una función dominante en la neovascularización del iris y en las retinopatías neovasculares. Aunque los informes demuestran claramente una correlación entre las concentraciones intraoculares de VEGF y la neovascularización ocular retinopática isquémica, FGF probablemente desempeña una función. Las FGF básica y ácida se conoce que están presentes en la retina normal del adulto, aun cuando cantidades detectables no se correlacionan constantemente con la neovascularización. Esto puede ser en gran medida debido al factor de que FGF se une muy estrechamente a los componentes cargados de la matriz extracelular y no puede estar disponible fácilmente en una forma libremente difundible que se detectaría por análisis convencionales de los fluidos intraoculares.

Una vía final frecuente en la respuesta angiogénica implica intercambio de información mediada por integrina entre una célula endotelial vascular proliferante y la matriz extracelular. Esta clase de receptores de adhesión, denominados integrinas, se expresan como heterodímeros con una subunidad α y β en todas las células. Dicha integrina, $\alpha_v\beta_3$, es el miembro más promiscuo de esta familia y permite que las células endoteliales interactúen con una amplia variedad de componentes de la matriz extracelular. Los antagonistas del péptido y del anticuerpo de esta integrina inhiben la angiogénesis mediante apoptosis inducida selectivamente de las células endoteliales vasculares proliferantes. Existen dos vías de angiogénesis dependientes de la citocina y pueden definirse por su dependencia de distintas integrinas de las células vasculares, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$. Específicamente, la angiogénesis provocada por FGF básica y VEGF depende de la integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, respectivamente, ya que los antagonistas del anticuerpo de cada integrina bloquean selectivamente una de estas vías angiogénicas en los modelos de membrana de la córnea del conejo y corioalantoica del pollo (CAM). Los antagonistas peptídicos que bloquean todas las integrinas α_v inhiben la angiogénesis estimulada por FGF y VEGF. Aunque los vasos sanguíneos oculares humanos normales no presentan ninguna de las dos integrinas, las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ se presentan selectivamente en los vasos sanguíneos en los tejidos de pacientes con enfermedad ocular neovascular activa. Aunque solamente se observó $\alpha_v\beta_3$ constantemente en el tejido de pacientes con ARMD, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ estaban ambas presentes en el tejido de pacientes con PDR. Los antagonistas peptídicos de integrinas administrados sistemáticamente bloquearon la formación de nuevos vasos sanguíneos en un modelo de vasculogénesis de la retina de ratón.

Por consiguiente, los agentes antiangiogénicos desempeñan una función en el tratamiento de la degeneración de la retina para impedir efectos dañinos de estos factores tróficos y de crecimiento. Los agentes angiogénicos también desempeñan una función en la activación de la vascularización deseable al retardar la degeneración de la retina aumentando el flujo sanguíneo a las células.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado, soluble en agua que está constituido por la secuencia de restos de aminoácidos de SEC. ID. n°: 12 o un fragmento inhibidor de angiogénesis de la misma, teniendo dicho polipéptido aislado un tamaño no superior a 45 kilodaltons.

ES 2 318 063 T3

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que presenta la secuencia del resto de aminoácidos de la SEC. ID. nº: 7.

5 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que codifica un polipéptido aislado y soluble en agua de cualquiera de los aspectos primero y segundo de la presente invención.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un vector recombinante que comprende el polinucleótido aislado del tercer aspecto de la presente invención.

10 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedadora recombinante que incluye el vector del cuarto aspecto de la presente invención o que expresa al polipéptido del primer aspecto de la presente invención.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona la utilización de un polipéptido soluble en agua constituido por la secuencia del resto de aminoácido de SEC. ID. nº: 12 o un fragmento inhibidor de la neovascularización ocular de la misma para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir la neovascularización ocular en un paciente que comprende administrar dicha composición farmacéutica a dicho paciente en una cantidad que inhiba la neovascularización ocular.

20 En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona una composición angiostática inyectable que comprende un polipéptido constituido por la secuencia del resto de aminoácidos de la SEC. ID. nº: 12 o un fragmento inhibidor de angiogénesis de la misma, y un excipiente acuoso farmacológicamente aceptable, conteniendo la composición el polipéptido en una concentración de por lo menos 0,1 miligramos por mililitro del excipiente acuoso.

25 En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un kit para inhibir la neovascularización ocular que comprende una cantidad de un polipéptido del primer aspecto de la presente invención suficiente para por lo menos una administración de una sola dosis, envasada en un recipiente adecuado, por lo menos una aguja de jeringuilla con auto-sellado que presenta un calibre inferior a 33, adecuado para la inyección intravítrea, y por lo menos una jeringuilla calibrada con precisión.

30 Las formas de realización preferidas de los aspectos de la presente invención están publicadas en las reivindicaciones 2 a 6, 12 a 23, 25 y 27.

35 Los polipéptidos derivados de triptofanil-ARNt sintetasa, más cortos que los naturales, tienen actividad de quimioquina y son útiles para investigación, diagnóstico, pronóstico y aplicaciones terapéuticas. En una forma de realización, estos polipéptidos derivados de ARNt sintetasa son útiles para regular la función de las células endoteliales vasculares, y en particular, para inhibir la angiogénesis, especialmente la neovascularización ocular.

40 Estos polipéptidos derivados de triptofanil-ARNt truncado sintetasa tienen un truncamiento en el terminal amino, pero pueden incluir un dominio de unión al nucleótido con pliegue de Rossmann. Estos polipéptidos son capaces de regular la función de la célula endotelial vascular.

45 La composición y las formas farmacéuticas que incluyen polipéptidos derivados de triptofanil-ARNt truncado sintetasa junto con un excipiente farmacéuticamente adecuado, son adecuadas para administración intraocular, p. ej., intravítrea, subretiniana o similares, así como para la administración generalizada, p. ej., administración transdérmica, a través de las mucosas, entérica o parenteral.

50 Una cantidad de polipéptido inhibidora de angiogénesis junto con un excipiente o vehículo apropiado, fisiológicamente compatible es útil en el tratamiento de las enfermedades oculares neovasculares tales como la degeneración macular relacionada con la edad, las complicaciones oculares de la diabetes, el glaucoma rubeótico, la retinopatía prematura, la queratitis, la retinopatía isquémica (p. ej., células depranocíticas), la miopía patológica, la histoplasmosis ocular, la pterygia, la coroidopatía interna punitiva y similares.

Breve descripción de los dibujos

55 En los dibujos,

La Figura 1 presenta la secuencia de restos de aminoácidos del polipéptido triptofanil-ARNt sintetasa (SEC. ID. nº: 1) con secuencias de identificación incluidas (SEC. ID. nº: 10 y SEC. ID. nº: 11) presentadas en un recuadro, comprendidas también en la forma truncada (secuencias de restos de aminoácidos 94-471 de la SEC. ID. nº: 1);

60 la Figura 2 es una fotomicrografía que ilustra el desarrollo vascular retiniano en un modelo de ratón;

la Figura 3 es una representación gráfica de los datos indicados en el Ejemplo 3, más adelante;

65 la Figura 4 es una representación gráfica de los datos indicados en el Ejemplo 4, más adelante; y

la Figura 5 es una fotomicrografía que ilustra la localización del enlace de un fragmento de TrpRS (T2) en la retina en un modelo de ratón.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas*Definiciones*

5 “Polipéptidos truncados de ARNt sintetasa” significa polipéptidos que son más cortos que la correspondiente ARNt sintetasa completa.

“TrpRS” significa triptofanil-ARNt sintetasa.

10 “Cultivo celular” comprende tanto el medio de cultivo como las células cultivadas.

La frase “aislamiento de un polipéptido del cultivo celular” comprende el aislamiento de un polipéptido soluble o segregado del medio de cultivo así como el aislamiento de una proteína de la membrana íntegra de las células cultivadas.

15 “Extracto celular” incluye el medio de cultivo, especialmente el medio de cultivo agotado del que se han extraído las células. Un extracto celular que conprenta el ADN o proteína de interés debe entenderse que significa una preparación de homogeneizado o una preparación exenta de células obtenida a partir de las células que expresan la proteína o que contienen el ADN de interés.

20 “Plásmido” es una molécula de ADN autónomo, extracromosómico autorreplicante y se designa mediante una letra “p” minúscula precedida y/o seguida de letras mayúsculas y/o números. Los plásmidos de partida en la presente memoria están disponibles en el mercado, disponibles para el público en base no limitada, o pueden ser considerados plásmidos disponibles de acuerdo con los procedimientos publicados. Además, plásmidos equivalentes a los descritos son conocidos en la técnica y son evidentes para cualquier especialista experto.

30 “Digestión” de ADN se refiere a la escisión catalítica del ADN con una enzima de restricción que actúa sólo en determinadas secuencias en el ADN. Las diversas enzimas de restricción utilizadas en la presente memoria están disponibles en el mercado y sus condiciones de reacción, cofactores y otros requisitos se utilizaron como conocería cualquier especialista experto. Con fines analíticos, se utiliza por lo general 1 μ g de plásmido o de fragmento de ADN aproximadamente con 2 unidades de enzima en aproximadamente 20 μ l de solución de tampón. Con objeto de aislar fragmentos de ADN para la construcción del plásmido, por lo general se digieren 5 a 50 μ g de ADN con 20 a 250 unidades de enzima en un volumen mayor. Los tampones apropiados y las cantidades de sustrato para las enzimas de restricción específicas están especificados por el fabricante. Se utilizan habitualmente tiempos de incubación de 35 aproximadamente 1 hora a 37°C, pero pueden oscilar de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Tras la digestión la reacción se electroforiza directamente en un gel de poliacrilamida para aislar el fragmento deseado. Los nucleótidos presentes en varios fragmentos de ADN y ARN se designan en la presente memoria mediante las denominaciones habituales de una sola letra (A, T, C, G y U) utilizadas en la materia.

40 “Polinucleótido” que expresa la presente invención puede estar en forma de ARN o en forma de ADN, ADN que incluye el ADNc, ADN genómico y ADN sintético. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la cadena de codificación o la cadena sin codificación (complementaria). La secuencia de codificación que codifica al polipéptido maduro puede ser idéntica a la secuencia de codificación mostrada en SEC. ID. n°: 6 o puede ser una secuencia de codificación diferente cuya secuencia de codificación, como resultado de la 45 redundancia o degeneración del código genético, codifica la misma secuencia polipeptídica madura mostrada en la SEC. ID. n°: 7.

50 La expresión “polinucleótido que codifica un polipéptido” comprende un polinucleótido que incluye solamente la secuencia de codificación para el polipéptido así como un polinucleótido que incluye la codificación adicional y/o la secuencia no codificadora.

55 “Oligonucleótidos” se refiere a un polinucleótido monocatenario o a dos cadenas de polinucleótido complementarias que pueden sintetizarse químicamente. Dichos oligonucleótidos sintéticos no tienen fosfato en 5' y por lo tanto no se ligarán a otro oligonucleótido sin añadir un fósforo con un ATP en presencia de una cinasa. Un oligonucleótido sintético se ligará a un fragmento que no ha sido desfosforilado.

60 “Resto de aminoácidos” se refiere a un aminoácido que es una parte de un polipéptido. Los restos de aminoácido descritos en la presente memoria están preferentemente en la forma isomérica “L”. Sin embargo, los restos en la forma isomérica “D” pueden sustituirse por cualquier resto de L-aminoácido, siempre que la propiedad funcional deseada sea conservada por el polipéptido. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el terminal amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el terminal carboxilo de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura de polipéptidos habitual descrita en *J. Biol. Chem.*, 243:3552-59 (1969) y adoptada en 37 C.F.R. § § 1.821 - 1.822 las abreviaturas para los restos de aminoácidos se presentan en la Tabla siguiente:

65

TABLA 1

Tabla de correspondencia

5

SÍMBOLO

	1 letra	3 letras	AMINOÁCIDO
10	Y	Tyr	tirosina
	G	Gly	glicina
	F	Phe	fenilalanina
	M	Met	metionina
15	A	Ala	alanina
	S	Ser	serina
	I	Ile	isoleucina
	L	Leu	leucina
20	T	Thr	treonina
	V	Val	valina
	P	Pro	prolina
	K	Lys	lisina
25	J	His	histidina
	Q	Gln	glutamina
	E	Glu	ácido glutámico
	Z	Glx	Glu y/o Gln
30	W	Trp	triptófano
	R	Arg	arginina
	D	Asp	ácido aspártico
	N	Asn	asparagina
35	B	Asx	Asn y/o Aspecto
	C	Cys	cisteína
	X	Xaa	desconocido u otro

40

Todas las secuencias de restos de aminoácidos representadas en la presente memoria por fórmulas presentan una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional del terminal amino al terminal carboxilo. Además, la frase “resto de aminoácido” está ampliamente definida para incluir los aminoácidos listados en la Tabla 1 así como los aminoácidos modificados y no habituales, tales como los referidos en 37 C.F.R. § § 1.821 - 1.822, e incorporados en la presente memoria como referencia. Un guión al comienzo o final de una secuencia de restos de aminoácidos indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más restos de aminoácidos o a un grupo con terminal amino tal como NH₂ o a un grupo con terminal carboxilo tal como COOH.

45

En un péptido o proteína, las sustituciones conservadoras adecuadas de aminoácidos son conocidas por los expertos en esta materia y pueden realizarse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en esta materia reconocen que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en zonas no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, p. ej., Watson *et al. Molecular Biology of the Gene*, 4ª edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224).

55

60

65

ES 2 318 063 T3

Dichas sustituciones se realizan preferentemente de acuerdo con las publicadas en la Tabla 2 siguiente:

TABLA 2

	Resto original	Sustitución conservadora
5	Ala (A)	Gly; Ser
	Arg (R)	Lys
10	Asn (N)	Gln; His
	Cys (C)	Ser
	Gln (Q)	Asn
	Glu (E)	Asp
15	Gly (G)	Ala; Pro
	His (H)	Asn; Gln
	Ile (I)	Leu; Val
	Leu (L)	Ile; Val
20	Lys (K)	Arg; Gln; Glu
	Met (M)	Leu; Tyr; Ile
	Phe (F)	Met; Leu; Tyr
	Ser (S)	Thr
25	Thr (T)	Ser
	Trp (W)	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe
30	Val (V)	Ile; Leu

Se pueden permitir también otras sustituciones y pueden determinarse experimentalmente o de acuerdo con las sustituciones conservadoras conocidas.

“Plásmido complementario” describe vectores de plásmido que liberan ácidos nucleicos en una estirpe celular encapsulada para la integración estable en el interior de un cromosoma en el genoma celular.

“Plásmido de abastecimiento” es un vector plásmido que lleva o abastece ácidos nucleicos que codifican un gen terapéutico o un gen que codifica un producto terapéutico o un precursor del mismo o un gen regulador u otro factor que produce un efecto terapéutico cuando se administra *in vivo* en o en el interior de una estirpe celular, tal como, pero sin limitarse a una estirpe celular encapsulada, para propagar vectores víricos terapéuticos.

En la presente memoria se describe una variedad de vectores. Por ejemplo, se utiliza un vector para administrar moléculas de ácido nucleico específicas en una estirpe celular encapsulada para la integración estable en un cromosoma. Estos tipos de vectores están identificados generalmente en la presente memoria como plásmidos complementarios. Un tipo más de vector descrito en la presente memoria lleva o suministra moléculas de ácido nucleico en o dentro de una estirpe celular (p. ej. estirpe celular encapsulada) con el fin de propagar vectores víricos terapéuticos; por consiguiente, estos vectores se denominan generalmente en la presente memoria plásmidos de liberación. Un tercer “tipo” de vector descrito en la presente memoria se utiliza para transportar moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas o polipéptidos terapéuticos o proteínas reguladoras o son secuencias reguladoras para células específicas o tipos de células en un paciente necesitado de tratamiento; estos vectores son generalmente identificados en la presente memoria como vectores víricos terapéuticos o vectores adenovíricos recombinantes o vectores derivados de Ad y están en forma de una partícula de virus que encapsula un ácido nucleico vírico que con presenta una casete de expresión para expresar el gen terapéutico.

“ADN o ácido nucleico homólogo” se refiere a un ácido nucleico que incluye una secuencia nucleotídica conservada preseleccionada, tal como una secuencia que codifica un polipéptido terapéutico. La expresión “sustancialmente homólogo” significa que presenta por lo menos 80%, preferentemente por lo menos 90%, aún más preferentemente por lo menos 95% de homología con ésta o un porcentaje menor de homología o identidad y de actividad o función biológica conservada.

Los términos “homología” e “identidad” se utilizan con frecuencia indistintamente. A este respecto, el grado de homología o identidad puede determinarse, por ejemplo, combinando la información de la secuencia utilizando un programa informático GAP. El programa GAP utiliza el procedimiento de alineación de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), estudiado por Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981). En resumen, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, dividido por el número total de símbolos en las secuencias más cortas de las dos. Los parámetros por defecto preferidos para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que con presenta un valor de 1 para

identidades y 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gibskov y Burgess, *Nucl. Acids Res.* 14:6745 (1986), tal como describe Schwartz y Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para los huecos finales. Si alguna de las dos moléculas de ácido nucleico tienen secuencias nucleotídicas que son por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% “idénticas” pueden determinarse utilizando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa “FASTA”, que utiliza, por ejemplo, los parámetros por defecto como en Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988). Alternativamente puede utilizar la función BLAST de la base de datos del National Center for Biotechnology Information para determinar la identidad. En general, las secuencias se alinean de modo que se obpre-senta igualdad de orden superior. “Identidad” por sí misma presenta un significado reconocido en la materia y puede calcularse utilizando las técnicas publicadas. (Véase, p. ej.: *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed. Oxford University Press, Nueva York, (1988); Smith, D.W., ed., *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Academic Press, Nueva York, (1993); Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Humana Press, Nueva Jersey, (1994); von Heinje, G., *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press, (1987); y Gribskov, M. y Devereux, J., eds., *Sequence Analysis Primer*, M. Stockton Press, Nueva York, (1991)). Aunque existen numerosos procedimientos para medir la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos, el término “identidad” es bien conocido por los especialistas expertos (Carillo, H. y Lipton, D., *SIAM J. Applied Math.* 48:1073 (1988)). Los métodos empleados habitualmente para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, los dados a conocer en Martin J. Bishop, ed., *Guide to Huge Computers*, Academic Press, San Diego, (1994), y Carillo, H. y Lipton, D., *SIAM J. Applied Math.* 48:1073 (1988). Los procedimientos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas informáticos. Los procedimientos preferidos del programa informático para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan al, paquete del programa GCG (Devereux, J. *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12(I):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., *et al.*, *J. Molec. Biol.* 215:403 (1990)).

El término “identidad” representa una comparación entre una prueba y un polipéptido o polinucleótido de referencia. Por ejemplo, un polipéptido de prueba puede definirse como cualquier polipéptido que sea 90% o más idéntico a un polipéptido de referencia. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término por lo menos “90% idéntico a” se refiere a identidades por ciento desde 90 hasta 99,99 con respecto a los polipéptidos de referencia. La identidad a un nivel del 90% o más es indicativa del hecho de que, suponiendo a título de ejemplo se comparan una longitud de 100 aminoácidos del polinucleótido de prueba y de referencia. No más del 10% (es decir, 10 de cada 100) aminoácidos en el polipéptido de prueba se diferencian del de los polipéptidos de referencia. Pueden hacerse comparaciones similares entre unos polipéptidos de prueba y de referencia. Dichas diferencias pueden estar representadas como mutaciones puntuales distribuidas al azar sobre toda la longitud de la secuencia de aminoácidos o pueden estar contenidas en una o más posiciones de longitud variable hasta el máximo permisible, p. ej., diferencia de aminoácidos 10/100 (aproximadamente 90% de identidad). Las diferencias se definen como sustituciones o eliminaciones de ácido nucleico o aminoácido.

Las expresiones “terapia génica” y “terapia genética” se refieren a la transferencia del ADN heterólogo para determinadas células, células diana, de un mamífero, particularmente de un ser humano, con un trastorno o enfermedades para las que se busca la terapia. El ADN se introduce en las células diana seleccionadas de tal manera que se expresa el ADN heterólogo y se produce un producto terapéutico codificado por éste. Alternativamente, el ADN heterólogo puede mediar de alguna manera la expresión del ADN que codifica el producto terapéutico, puede codificar un producto, tal como un péptido o ARN que de alguna manera media, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. La terapia genética puede utilizarse también para reemplazar un gen defectuoso o complementar un producto génico producido por el mamífero o la célula en la que se introduce. El ácido nucleico introducido puede codificar un compuesto terapéutico, tal como un factor de crecimiento o un inhibidor del mismo, o un factor de la necrosis tumoral o un inhibidor de la misma, tal como un receptor para éste, que normalmente no se produce en el mamífero hospedador o que no se produce en cantidades terapéuticamente eficaces o en un periodo terapéuticamente útil. El ADN heterólogo que codifica el producto terapéutico puede modificarse antes de la introducción en las células del hospedador afectado con objeto de potenciar o si no alterar el producto o la expresión del mismo.

“ADN heterólogo” es el ADN que codifica el ARN y las proteínas que no son producidas normalmente *in vivo* por la célula en la que se expresa o que media o codifica mediadores que alternan la expresión del ADN endógeno afectando la transcripción, traducción u otros procedimientos bioquímicos regulables. El ADN heterólogo puede denominarse también ADN extraño. Cualquier ADN que un experto en la materia reconozca o considere como heterólogo o extraño a la célula en la que se expresa está comprendido en la misma por el ADN heterólogo. Ejemplos de ADN heterólogos incluyen, pero no se limitan al ADN que codifica proteínas marcadoras rastreables, tales como una proteína que proporciona resistencia al fármaco, el ADN que codifica sustancias terapéuticamente eficaces, tales como los agentes anticancerígenos, enzimas y hormonas y el ADN que codifica otros tipos de proteínas, tales como los anticuerpos. Los anticuerpos que son codificados por el ADN heterólogo pueden segregarse o expresarse en la superficie de la célula en la que el ADN heterólogo se ha introducido. Por consiguiente, “ADN heterólogo” o “ADN extraño”, se refiere a una molécula de ADN que no está presente en la orientación y posición exactas como molécula de ADN de contrapartida encontrada en el adenovirus natural correspondiente. Puede referirse también a una molécula de ADN de otro organismo o especie (es decir, exógeno) o de otro serotipo Ad.

“Producto de ADN terapéuticamente eficaz” es un producto que está codificado por el ADN heterólogo de modo que, durante la introducción del ADN en un hospedador, se expresa un producto que mejora eficazmente o elimina los

ES 2 318 063 T3

síntomas, las manifestaciones de una enfermedad hereditaria o adquirida o que cura dicha enfermedad. Por lo general, el ADN que codifica el ADN heterólogo deseado se clona en un vector plásmido y se introduce por procedimientos rutinarios, tales como la absorción o microinyección el ADN mediada por fosfato cálcico, en células productoras, tales como las células encapsuladas. Tras la ampliación en las células productoras, los vectores que contienen el ADN heterólogo se introducen en las células diana seleccionadas.

“Vector de expresión o distribución” se refiere a cualquier plásmido o virus en el que puede insertarse un ADN extraño o heterólogo para su expresión en una célula hospedadora adecuada, es decir, la proteína o polipéptido codificado por el ADN se sintetiza en el sistema de la célula hospedadora. Los vectores capaces de dirigir la expresión de segmentos de ADN (genes) que codifican una o más proteínas se denominan en la presente memoria “vectores de expresión”. Asimismo están incluidos los vectores que permiten la clonación del ADNc (ADN complementario) procedente de los ARNm producidos utilizando la transcriptasa inversa.

“Gen” es una molécula de ácido nucleico cuya secuencia nucleotídica codifica el ARN o polipéptido. Un gen puede ser ARN o ADN. Los genes pueden incluir zonas que preceden y que siguen a la zona de codificación (anterior y posterior) así como las secuencias de intervención (intrones) entre segmentos individuales de codificación (exones).

“Aislada” con relación a una molécula de ácido nucleico, polipéptido u otra biomolécula, significa que el ácido nucleico o polipéptido se ha separado del entorno genético del cual se obtuvieron el polipéptido o el ácido nucleico. Puede también significar el estado alterado a partir del natural. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido natural en un animal vivo no está “aislado”, pero tal como se emplea el término en la presente memoria, el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está “aislado”. Por lo tanto, un polipéptido o polinucleótido producido y/o contenido dentro de la célula hospedadora recombinante se considera aislado. Asimismo “polipéptido aislado” o un “polinucleótido aislado” quiere decir polipéptidos o polinucleótidos que han sido purificados, parcial o sustancialmente, a partir de una célula hospedadora recombinante o de una fuente natural. Por ejemplo, una versión de un compuesto producida por recombinación genética puede estar sustancialmente purificada por el procedimiento de una etapa descrito en Smith y Johnson, *Gene* 67:31-40 (1988). Los términos “aislado” y “purificado” se utilizan a veces indistintamente. Dicho polipéptido podría formar parte de un vector y/o dicho polinucleótido o polipéptido podría formar parte de una composición, y todavía estaría aislado porque dicho vector o composición no forma parte de su entorno natural.

“Polinucleótido aislado” significa que el ácido nucleico carece de las secuencias de codificación de estos genes que, en el genoma natural del organismo (si existe) flanquean inmediatamente el gen que codifica el ácido nucleico de interés. El ADN aislado puede ser monocatenario o bicatenario, y puede ser ADN genómico, ADNc, ADN híbrido recombinante o ADN sintético. Puede ser idéntico a una secuencia de ADN natural o puede diferenciarse de dicha secuencia por eliminación, adición o sustitución de uno o más nucleótidos.

“Aislada” o “purificada” en cuanto se refiere a las preparaciones a partir de células u hospedadores biológicos significa cualquier extracto celular que con presenta el ADN o la proteína indicados incluyendo un extracto en bruto del ADN o proteína de interés. Por ejemplo, en el caso de una proteína, puede obtenerse una preparación purificada siguiendo una técnica individual o una serie de técnicas de preparación o bioquímicas y el ADN o proteína de interés pueden estar presentes en varios grados de pureza en estas preparaciones. Los procedimientos pueden incluir por ejemplo, pero no se limitan a, fraccionamiento del sulfato amónico, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por afinidad, centrifugación por gradiente de densidad y electroforesis.

Una preparación de ADN o proteína que está “sustancialmente pura” o “aislada” significa una preparación exenta de materiales naturales con la que dicho ADN o proteína está asociado normalmente en la naturaleza. “Esencialmente pura” debería entenderse que significa una preparación “muy” purificada que con presenta por lo menos el 95% del ADN o de la proteína de interés.

“Estirpe celular de encapsulación” es una estirpe celular que proporciona un producto génico desaparecido o su equivalente.

“Partícula vírica de adenovirus” es la estructura mínima o la unidad funcional de un virus. Un virus puede referirse a una sola partícula, a una solución madre de partículas o a un genoma vírico. La partícula de adenovirus (Ad) es relativamente compleja y puede resolverse en varias subestructuras.

“Elemento regulador de la postranscripción (PRE)” es un elemento regulador encontrado en el ARN mensajero celular que no está cortado ni empalmado, es decir, mensajes sin intrón. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan al virus de la hepatitis humana, al virus de la hepatitis de la marmota americana, al gen TK ni al gen de la histona de ratón. El PRE puede colocarse antes de una secuencia poliA y después de una secuencia de ADN heterólogo.

“Pseudotipado” describe la producción de vectores adenovíricos que tienen la proteína de la cápside modificada o las proteínas de la cápside de un serotipo diferente al del serotipo del propio vector. Un ejemplo, es la producción de una partícula del vector 5 de adenovirus que con presenta una proteína de la fibra Ad37. Esto puede realizarse produciendo el vector adenovírico en estirpes celulares de encapsulación que expresan diferentes proteínas de la fibra.

ES 2 318 063 T3

Los “activadores de interés en la presente memoria” pueden ser inducibles o constitutivos. Los activadores inducibles iniciarán la transcripción solamente en presencia de una molécula adicional; los activadores constitutivos no requieren la presencia de ninguna molécula adicional para regular la expresión génica. Un activador regulable o inducible puede describirse también como activador cuando la cantidad o extensión de la unión e iniciación de la ARN polimerasa está modulada por estímulos externos. Dichos estímulos incluyen, pero no se limitan a varios compuestos o composiciones, fuentes de energía luminosa, térmica, de tensión y química. Los activadores inducibles, suprimibles y reprimibles se consideran activadores regulables. Los activadores preferidos en la presente memoria son activadores que se expresan selectivamente en las células oculares, particularmente en las células fotorreceptoras.

“Receptora” se refiere a una molécula biológicamente activa que se une específicamente a (o con) otras moléculas. La expresión “proteína receptora” puede utilizarse para indicar más específicamente la naturaleza proteínica de un receptor específico.

“Recombinante” se refiere a toda descendencia formada como resultado de la ingeniería genética. Éste puede utilizarse también para describir un virus formado por recombinación de plásmidos en una célula encapsulada.

“Transgén” o “molécula terapéutica de ácido nucleico” incluye las moléculas de ADN y ARN que codifican un ARN o polipéptido. Dichas moléculas pueden ser secuencias “naturales” o derivadas de las naturales; pueden ser también “artificiales” o “extrañas” que derivan de las naturales o por recombinación. El término “transgén”, que puede utilizarse indistintamente en la presente memoria con la expresión “molécula terapéutica de ácido nucleico”, se utiliza con frecuencia para describir un gen heterólogo o extraño (exógeno) que es transportado por un vector vírico y transcrito en una célula hospedadora. Las moléculas terapéuticas de ácido nucleico incluyen secuencias complementarias o secuencias nucleotídicas que pueden transcribirse en secuencias complementarias. Todas las secuencias nucleotídicas terapéuticas (o transgenes) incluyen moléculas de ácido nucleico que funcionan para producir un efecto deseado en la célula o en el núcleo celular en el que se administran dichas secuencias terapéuticas. Por ejemplo, una molécula terapéutica de ácido nucleico puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína funcional deseada para la administración en una célula que es inque puede producir esta proteína funcional.

“Vítreo del ojo” se refiere a un material que rellena la cámara posterior del cristalino del ojo (es decir, humor vítreo o cuerpo vítreo).

“Zona activadora” se refiere a la parte del ADN de un gen que controla la transcripción del ADN al que está unido operativamente. La zona activadora incluye secuencias específicas de ADN que son suficientes para el reconocimiento, unión e iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa. Esta parte de la zona activadora se denomina activador. Además, la zona activadora incluye secuencias que modulan esta actividad de reconocimiento, unión e iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa. Estas secuencias pueden ser factores de actuación *cis* o pueden ser sensibles a factores de actuación *trans*. Los activadores, que dependen de la naturaleza de la regulación pueden ser constitutivos o regulados.

“Operativamente unida” significa que las secuencias o segmentos se han unido por enlace covalente en una pieza de ADN, ya sea en forma mono o bicatenaria, por lo que controlan las secuencias en una expresión o replicación de control del segmento u otro control de otros segmentos. Sin embargo los dos segmentos no están necesariamente contiguos.

“Encapsulado” se refiere a una matriz sólida o material tales como vidrio, plástico (p. ej., polietileno, polipropileno o policarbonato), papel, hoja de aluminio y similares capaces de mantener dentro de límites fijados a un polipéptido, anticuerpo policlonal o anticuerpo monoclonal descrito en la presente memoria. De este modo, por ejemplo, un envase puede ser un vial de vidrio utilizado para contener cantidades en miligramos de un polipéptido contemplado o puede ser un pocillo de una placa de microvaloración a la que se han fijado (es decir, unido) de manera operativa cantidades de un polipéptido o anticuerpo para que sea que puede estar inmunológicamente unida por un anticuerpo o antígeno, respectivamente.

“Instrucciones para su utilización” incluyen típicamente una expresión tangible que describe la concentración de reactivo o por lo menos un parámetro del procedimiento de análisis, tal como las cantidades relativas de reactivo y de muestra que deben mezclarse, los periodos de mantenimiento para las mezclas reactivo/muestra, temperatura, condiciones del tampón y similares.

“Sistema de diagnóstico” en el contexto de la presente invención incluye también un marcador o medios indicadores capaces de señalar la formación de un inmunocomplejo que con presenta un polipéptido o una molécula de anticuerpo descrita en la presente memoria.

“Complejo” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al producto de una reacción de unión específica tal como una reacción anticuerpo-antígeno o receptor-ligando. Los complejos a título de ejemplo son productos de inmunorreacción.

“Marcador” y “medios indicadores” en sus diversas formas gramaticales se refieren a átomos y moléculas individuales que están implicados directa o indirectamente en la producción de una señal detectable para indicar la presencia

de un complejo. Cualquier marcador o medios indicadores pueden estar unidos a una proteína, polipéptido o molécula de anticuerpo expresados o incorporados a los mismos, que forma parte de un anticuerpo o de una composición de anticuerpo monoclonal descrita en la presente memoria o utilizados por separado, y los átomos o moléculas pueden utilizarse solos o conjuntamente con reactivos adicionales. Dichos marcadores son bien conocidos en la química de diagnóstico clínico y constituyen una parte de la presente invención únicamente siempre que se utilicen sino con las utilizaciones y/o sistemas de nuevas proteínas.

Exposición

El polipéptido mostrado en la Figura 1 como restos de aminoácidos 94-471 de la SEC. ID. n°: 1 (p. ej., SEC. ID. n°: 12), así como los que presentan la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. n°: 7, o el polipéptido codificado por el ADNc de la SEC. ID. n°: 6, constituyen partes de la presente invención. La presente invención incluye polinucleótidos que codifican el mismo polipéptido mostrado en la SEC. ID. n°: 7, SEC. ID. n°: 12 y el polipéptido codificado por el ADNc de la SEC. ID. n°: 6 así como variantes de dichos polinucleótidos cuyas variantes codifican un fragmento inhibidor de angiogénesis de los polipéptidos de la SEC. ID. n°: 7 y la SEC. ID. n°: 12.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término T1 se refiere tanto al polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. n°: 13 como al polipéptido activado por His₆ que presenta la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. n°: 5. El término T2, tal como se emplea en la presente invención, se refiere tanto al polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. n°: 12 como al polipéptido activado por His₆ que presenta la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. n°: 7. El término TrpRS, tal como se emplea en la presente invención, se refiere tanto al polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos de los restos 1-471 de la SEC. ID. n°: 1 como al polipéptido activado por His₆ que presenta la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. n°: 1.

En los polinucleótidos, la secuencia de codificación para el polipéptido maduro puede fusionarse en el mismo marco de lectura a un polinucleótido que ayuda a la expresión y secreción de un polipéptido de una célula hospedadora, por ejemplo, una secuencia principal que funciona como secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula. El polipéptido que presenta una secuencia principal es una preproteína y puede tener la secuencia principal separada por la célula hospedadora para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos pueden también codificar una preproteína que es la proteína madura más los restos adicionales de aminoácidos en 5'. Una proteína madura que presenta una prosequencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez se escinde la prosequencia queda una proteína madura activa.

De este modo, por ejemplo, el polinucleótido puede codificar una proteína madura, o una proteína que presenta una prosequencia o una proteína que presenta tanto una prosequencia como una presequencia (secuencia principal).

Los polinucleótidos pueden tener también la secuencia de codificación fusionada en el marco a una secuencia marcadora que permite la purificación del polipéptido de la presente invención. La secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexa-histidina aportada por un vector pQE-9 para proporcionar la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un hospedador bacteriano, o, por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) cuando se utiliza un hospedador de mamífero, p. ej. células COS-7. La etiqueta HA corresponde a un epítipo procedente de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson, I., *et al.*, *Cell*, 37:767 (1984)).

Cuando se refiere al polipéptido de la SEC. ID. n°: 7, a la SEC. ID. n°: 12 o a un polipéptido codificado por el polinucleótido de la SEC. ID. n°: 6, el término "fragmento", significa una porción de polipéptido que conserva sustancialmente la misma función angiostática (es decir, que inhibe la angiogénesis) o a la actividad como tal polipéptido.

El polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido recombinante, un polipéptido natural o un polipéptido sintético, preferentemente un polipéptido recombinante.

Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención se proporcionan en forma aislada, y preferentemente se purifican hasta la homogeneidad.

La presente invención incluye también vectores que incluyen polinucleótidos de la presente invención, y células de hospedador que están modificadas genéticamente con los vectores de la invención.

Las células hospedadoras se modifican genéticamente (se transducen, transforman o transfectan) con los vectores de la presente invención que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, de partícula vírica, de fago, etc. Las células hospedadoras modificadas genéticamente pueden cultivarse en un medio nutritivo convencional modificado apropiado para los activadores del funcionamiento, seleccionando transformables o ampliando los genes polipeptídicos de la ARNt sintetasa. Las condiciones del cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas anteriormente con la célula hospedadora seleccionadas para la expresión y son evidentes para cualquier especialista experto.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden utilizarse para producir los correspondientes polipéptidos mediante técnicas recombinantes. De este modo, por ejemplo, la secuencia de polinucleótidos puede estar incluida en cualquiera de entre una variedad de vehículos de expresión, en particular vectores o plásmidos para expresar un polipéptido. Dichos vectores incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, p. ej., derivados

de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fago; plásmidos de levadura, vectores procedentes de combinaciones de plásmido y de ADN de fago, ADN vírico tal como vacunas, adenovirus, virus de peste aviar y pseudorrabia. Un vector citado es el pET20b. Sin embargo, puede utilizarse cualquier otro plásmido o vector siempre que sea replicable y viable en el hospedador.

Tal como se describió anteriormente, la secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el vector por una variedad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en unas secuencias apropiadas de endonucleasa de restricción por los procedimientos conocidos en la técnica. Se considera que dichos procedimientos y otros están incluidos dentro del alcance de los expertos en la materia.

La secuencia de ADN en el vector de expresión está operativamente unida a una(s) secuencia(s) de control de expresión apropiada(s) (activador) para dirigir la síntesis del ARNm. Ejemplos representativos de dichos activadores incluyen LTR o activador SV40, los activadores lac o trp de *E. coli*, el activador P_L del fago lambda y otros activadores conocidos para controlar la expresión de los genes en células procarióticas o eucarióticas o sus virus. El vector de expresión con presenta también una secuencia de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector puede también incluir secuencias apropiadas para ampliar la expresión.

Además, los vectores de expresión contienen preferentemente un gen para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de las células hospedadoras transformadas tales como resistencia a la dihidrofolato reductasa o a la neomicina para el cultivo de células eucarióticas, o tal como resistencia a la tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

El vector que con presenta la secuencia de ADN apropiada como se describió anteriormente en la presente memoria, así como una secuencia activadora o de control apropiada, puede emplearse para transformar un hospedador apropiado que permita al hospedador expresar la proteína. Ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen las células bacterianas, tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces*, células micóticas, tales como levadura; células de insecto, tales como *Drosophila* y Sf9; células de animales tales como CHO, COS o de melanoma de Bowes; células vegetales, etc. La selección de un hospedador apropiado se considera que está dentro del alcance de los expertos en la materia a partir de lo dado a conocer en la presente memoria.

Más específicamente, la presente invención incluye también montajes recombinantes que comprenden una o más de las secuencias tal como se describió con amplitud anteriormente. Los montajes comprenden un vector, tal como un vector plásmido o vírico, en el que se ha insertado una secuencia de la invención en una orientación transcrita o complementaria. En un aspecto preferido de la presente forma de realización, el montaje comprende además secuencias reguladoras, incluyendo, por ejemplo, un activador, operativamente unido a la secuencia. Los expertos en la materia conocen grandes cantidades de vectores y activadores adecuados, y están disponibles en el mercado. A título de ejemplo se proporcionan los vectores siguientes: Bacterianos: pQE70, pQE-9 (Qiagen), PBS, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH46a (Stratagene), pTrc99A, pKK223-3, pDR540, PRIT5 (Farmacia). Eucarióticos: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, PMSG, pSVL (Farmacia) y pET20B. En una forma de realización preferida, el vector es el pET20B. Sin embargo, puede utilizarse cualquier otro plásmido o vector siempre que sean replicables y viables en el hospedador.

Pueden seleccionarse zonas activadoras en cualquier gen deseado utilizando vectores de CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Los activadores bacterianos denominados específicos incluyen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P_R, PL y trp. Los activadores eucarióticos incluyen CMV precoz inmediato, timidina cinasa de VSH, SV40 precoz y tardío, las LTR de retrovirus y metaltoneína-I de ratón. La selección del vector y activador apropiados está dentro del nivel de cualquier experto en la materia.

En una forma de realización adicional, la presente invención se refiere a células hospedadoras que contienen el montaje descrito anteriormente. La célula hospedadora puede ser una célula eucariótica superior, tal como una célula de mamífero o una célula eucariótica inferior, tal como una célula de levadura o la célula hospedadora puede ser una célula procariótica, tal como una célula bacteriana. La introducción del montaje en la célula hospedadora puede efectuarse por transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano o electroporación (Davis, L., Dibner, M., Batty, I., Basic Methods in Molecular Biology, 1986).

Los montajes en las células hospedadoras pueden utilizarse de manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Alternativamente, los polipéptidos de la invención pueden ser producidos por síntesis por sintetizadores de péptidos convencionales.

Las proteínas pueden expresarse en células de mamífero, levaduras, bacterias u otras células bajo el control de activadores apropiados. Pueden emplearse también sistemas de traducción exentos de células para producir dichas proteínas utilizando los ARN derivados de los montajes de ADN de la presente invención. Los vectores de clonación y expresión apropiados para su utilización con hospedadores procarióticos y eucarióticos están descritos por Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), cuya exposición está incorporada a la presente memoria como referencia.

La transcripción de un ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa al insertar una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan

ES 2 318 063 T3

en cis, habitualmente desde alrededor de 10 a alrededor de 300 pares de bases (bp), que actúan en un activador para aumentar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de la replicación (100 a 270 bp), un potenciador del activador precoz de citomegalovirus, un potenciador de polioma en el lado tardío del origen de la replicación y potenciadores de adenovirus.

5 Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluirán los orígenes de la replicación y marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula hospedadora, p. ej., el gen con resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*, y un activador derivado de un gen muy expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural corriente abajo. Dichos activadores pueden proceder de enzimas glucolíticas que codifican operones tales como la 3-fosfoglicerato cinasa (PGK), factor α , fosfatasa ácida o proteínas de choque térmico, entre otros. La secuencia estructural heteróloga se monta en la fase apropiada con las secuencias de iniciación y terminación de la traducción, y preferentemente, una secuencia principal que puede dirigir la secreción de la proteína traducida en el espacio periplásmico o el medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido con identificación N-terminal que proporciona las características deseadas, p. ej., 15 estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.

Después de la transformación de una cepa de hospedador adecuada y el crecimiento de la cepa del hospedador hasta una densidad celular apropiada, el activador seleccionado es desreprimido por medios apropiados (p. ej., cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un periodo adicional.

20 Las células por lo general se recogen por centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos y el extracto en bruto resultante se conserva para purificación ulterior.

Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden romperse por cualquier procedimiento conveniente, incluyendo el ciclo de congelación-descongelación, tratamiento con ultrasonidos, ruptura mecánica o utilización de agentes de lisado celular.

Pueden emplearse también varios sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar la proteína recombinante. Ejemplos de sistemas de expresión de mamífero incluyen las estirpes COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritas por Gluzman, *Cell*, 23: 175 (1981), y otras estirpes celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las estirpes celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero comprenderán un origen de replicación, un activador y potenciador adecuados y también algunas secuencias de unión del ribosoma necesarias, secuencias de poliadenilación, secuencias donantes y receptoras de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias no transcritas flanqueantes en C5. Para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos pueden utilizarse las secuencias de ADN derivadas del genoma vírico SV40, por ejemplo, origen de SV40, activador precoz, potenciador, secuencias de corte y empalme y poliadenilación.

Se recuperan los polipéptidos y se purifican de los cultivos celulares recombinantes por los procedimientos utilizados hasta ahora, incluyendo la precipitación con sulfato amónico o etanol, la extracción con ácido, la cromatografía por intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía en fosfocelulosa, la cromatografía por interacción hidrofóbica, la cromatografía por afinidad, la cromatografía en hidroxipatito y la cromatografía en lectinas. Es preferible tener concentraciones bajas (aproximadamente 0,1 a 5 mM) de ión calcio presentes durante la purificación (Price, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 244:917 (1969)). Cuando sea necesario pueden utilizarse las etapas de repliegamiento de la proteína, en la terminación de la configuración de la proteína madura. Por último, puede emplearse cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) durante las etapas finales de la purificación.

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser un producto natural purificado, un producto de los procedimientos de síntesis química o ser producidos por técnicas recombinantes a partir de un hospedador procariótico o eucariótico (por ejemplo, mediante células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insecto y de mamífero en cultivo). Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glucosilados con carbohidratos de mamífero u otros eucarióticos o pueden no estar glucosilados.

Los polipéptidos de la presente invención pueden modificarse para mejorar la estabilidad y aumentar la potencia por medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, los L-aminoácidos pueden estar sustituidos por D-aminoácidos, el terminal amino puede estar acetilado o el terminal carboxi modificado, p. ej., protegido con etilamina (Dawson, D.W., *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 55:332-338 (1999)).

El polipéptido de la presente invención puede emplearse también como terapia génica según la presente invención mediante la expresión de dicho polipéptido *in vivo*.

Varios vectores víricos que pueden utilizarse para la terapia génica como se da a conocer en la presente memoria incluyen adenovirus, herpes virus, vacunas, virus adeno-asociados (AAV), o, preferentemente, un virus con ARN tal como un retrovirus. Preferentemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar o es un vector lentiviral. El vector retroviral preferido es un vector lentiviral. Ejemplos de vectores retrovirales en los que puede insertarse un solo gen extraño incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus del tumor de mama murino (MuMTV), VIS, VIB, VIH y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Numerosos vectores retrovirales adicionales pueden incorporar

múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de modo que las células transducidas pueden ser identificadas y generadas. Insertando una secuencia polipeptídica de interés que se une al ADN derivado del dedo de cinc en el vector vírico, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector se hace específico para la diana. Los vectores retrovíricos pueden hacerse específicos para la diana insertando, por ejemplo, un polinucleótido que codifica una proteína. La administración dirigida preferida se realiza utilizando un anticuerpo para dirigir el vector retrovírico. Los expertos en la materia conocerán, o pueden determinar fácilmente sin experimentación excesiva, secuencias polinucleotídicas específicas que pueden insertarse en el genoma retrovírico que permitan la administración específica de la diana del vector retrovírico que con presenta el polinucleótido de la proteína que se une al nucleótido con dedo de cinc.

Dado que los retrovirus recombinantes son defectuosos, requieren asistencia con objeto de producir partículas infecciosas de vector. Esta asistencia puede proporcionarse, por ejemplo, utilizando estirpes celulares colaboradoras que contienen plásmidos que codifican todos los genes estructurales del retrovirus bajo el control de secuencias reguladoras en la LTR. Estos plásmidos están ausentes en una secuencia nucleotídica que permite al mecanismo de encapsulación reconocer un ARN transcrito para la encapsulación. Las estirpes celulares colaboradoras que presentan eliminaciones de la señal de encapsulación incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, $\Psi 2$, PA317 y PA 12. Estas estirpes celulares producen viriones vacíos, ya que ningún genoma está encapsulado. Si se introduce un vector retrovírico dentro de dichas células en las que la señal de encapsulación está intacta, pero los genes estructurales se sustituyen por otros genes de interés, puede encapsularse el vector y producirse el virión del vector. Los viriones del vector producidos por este procedimiento pueden utilizarse a continuación para infectar una estirpe celular de tejido, tal como las células NIH 3T3, para producir grandes cantidades de viriones retrovíricos híbridos.

Otro sistema de administración dirigido para polinucleótidos que codifican polipéptidos que se unen al ADN derivado del dedo de cinc es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microsferas, perlas y sistemas a base de lípido incluyendo las emulsiones aceite-en-agua, micelas, micelas mezcladas y liposomas. El sistema coloidal preferido utilizado según la presente invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas artificiales de la membrana que son útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. Se ha demostrado que las vesículas unilaminares grandes (LUV), cuyo intervalo de tamaño está comprendido entre 0,2 y 4,0 μm pueden encapsular un porcentaje sustancial de un tampón acuoso que con presenta grandes macromoléculas. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse en el interior acuoso y administrarse a células en una forma biológicamente activa (Fraley, *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 6:77, (1981)). Además de las células de mamífero, se han utilizado liposomas para la administración de polinucleótidos en células vegetales, de levadura y bacterianas. Para que un liposoma sea un vehículo de transferencia génica eficaz, deben estar presentes las siguientes características: (1) encapsulación de los genes de interés con gran eficacia aunque sin comprometer su actividad biológica; (2) unión preferencial y sustancial a una célula diana en comparación con las células que no son diana; (3) administración de los contenidos acuosos de la vesícula al citoplasma de la célula diana con gran eficacia; y (4) expresión precisa y eficaz de la información genética (Mannino, *et al.*, *Biotechniques*, 6:682, (1988)).

La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos, particularmente de fosfolípidos de alta temperatura en la fase de transición, habitualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. Pueden utilizarse también otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, de la fuerza iónica y de la presencia de cationes divalentes.

Ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen los compuestos de fosfatidilo, tal como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Son particularmente útiles los diacilfosfatidilgliceroles, en los que el resto de lípido con presenta de 14 a 18 átomos de carbono, particularmente entre 16 y 18 átomos de carbono, y está saturado. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diesteroilfosfatidilcolina.

La administración dirigida de los liposomas se ha clasificado basándose en factores anatómicos y mecánicos. La clasificación anatómica está basada en el nivel de selectividad, por ejemplo, específico para el órgano, específico para la célula y específico para el orgánulo. La administración dirigida mecánica puede distinguirse basándose en si es pasiva o activa. La administración dirigida pasiva utiliza la tendencia natural de los liposomas a distribuirse en las células del sistema retículo-endotelial (RES) en los órganos que contienen capilares sinusoidales. La administración dirigida activa, por otra parte, implica la alteración del liposoma acoplado el liposoma a un ligando específico tal como un anticuerpo monoclonal, azúcar, glucolípido o proteína, o cambiando la composición o el tamaño del liposoma con objeto de conseguir la administración dirigida a los órganos y a los tipos de células distinta de las zonas de localización naturales.

La superficie del sistema de administración dirigida puede modificarse de varias maneras. En el caso de un sistema liposómico de administración dirigida, pueden incorporarse grupos de lípidos dentro de una bicapa de lípido del liposoma con objeto de mantener el ligando de administración dirigida en asociación estable con la bicapa liposómica. Pueden utilizarse varios grupos de enlace para unir las cadenas de lípido al ligando objetivo.

En general, los compuestos unidos a la superficie del sistema de administración dirigida serán ligandos y receptores que permitirán al sistema de administración dirigida encontrar y "residir" en las células deseadas. Un ligando puede ser cualquier compuesto de interés que se una a otro compuesto, tal como un receptor.

En general, las proteínas superficiales de la membrana que se unen a moléculas efectoras específicas se denominan receptores. En la presente invención, los anticuerpos son los receptores preferidos. Pueden utilizarse anticuerpos para dirigir liposomas a los ligandos específicos de la superficie de la célula. Por ejemplo, determinados antígenos expresados específicamente en las células tumorales, denominados antígenos asociados al tumor (TAA) pueden aprovecharse con el fin de dirigir liposomas que contienen la proteína de unión al nucleótido con dedo de cinc del anticuerpo directamente al tumor maligno. Ya que el producto génico de la proteína que se une al nucleótido con dedo de cinc puede indiscriminarse con respecto al tipo de célula en su función, un sistema de administración dirigida ofrece una mejora significativa sobre los liposomas no específicos que se inyectan al azar. Pueden utilizarse numerosos procedimientos para acoplar por enlace covalente anticuerpos policlonales o monoclonales a una bicapa de liposoma. Los liposomas dirigidos al anticuerpo pueden incluir anticuerpos monoclonales o policlonales o fragmentos de los mismos tales como Fab y F(ab')₂, siempre que se unan eficazmente a un epítipo antigénico en las células diana. Los liposomas pueden también estar dirigidos a las células que expresan receptores para hormonas u otros factores del suero.

Para un experto en la materia están disponibles múltiples procedimientos víricos y no víricos adecuados para la introducción de una molécula de ácido nucleico dentro de una célula diana. La manipulación genética de las células del tumor primario es bien conocida en la materia. La modificación genética de una célula puede realizarse utilizando una o más técnicas bien conocidas en el campo de la terapia génica (Mulligan, R.C. *Human Gene Therapy*, 5(4):543-563 (1993)). Los métodos de transducción vírica pueden comprender la utilización de un virus con ADN o ARN recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que conduce o inhibe la expresión de una proteína que presenta actividad de sialil-transferasa para infectar una célula diana. Un virus con ADN adecuado para su utilización en la presente invención incluye pero no está limitado a un adenovirus (Ad), virus adeno-asociado (AAV), herpes virus, virus de la vacuna o a un virus de la poliomelitis. Un virus con ARN adecuado para su utilización en la presente invención incluye pero no se limita a un retrovirus o a un virus de Sindbis. Los expertos en la materia entienden que existen varios de dichos virus con ADN y ARN que pueden ser adecuados para su utilización en la presente invención.

Los vectores adenovíricos son útiles para la transferencia génica en el interior de las células eucarióticas, para estudiar la expresión génica eucariótica, para el desarrollo de vacunas y en modelos de animales. La terapia génica mediada por Ad se ha utilizado también en seres humanos, tal como para la transferencia del gen regulador de la conductancia de la transmembrana en la fibrosis quística (CFTR) al pulmón. Las vías para administrar Ad recombinante a diferentes tejidos *in vivo* incluyen, por ejemplo, la instilación intratraqueal, la inyección en el músculo, la inyección intravenosa periférica y la inoculación estereotáctica al cerebro. El vector adenovírico, a continuación, es utilizado ampliamente por un experto en la materia y es adecuado para su utilización en la presente invención.

El virus adenoasociado (AAV) se ha introducido recientemente como un sistema de transferencia genética con aplicaciones potenciales en terapia génica. El AAV natural se ha descrito para demostrar infectividad a alto nivel, amplio intervalo del hospedador y especificidad en la integración en el genoma de la célula hospedadora. El virus simple del herpes de tipo I (VHS-1) es atractivo como sistema vectorial, especialmente para su utilización en el sistema nervioso a causa de su propiedad neurótropa. El virus de vacuna, de la familia poxvirus, se ha desarrollado también como vector de expresión. Un experto en la materia utiliza extensamente cada uno de los vectores descritos anteriormente y serían adecuados para su utilización en la presente invención.

Los vectores retrovíricos son capaces de infectar un gran porcentaje de células diana y de integrarse en el genoma celular. Los retrovirus se desarrollan como vectores de transferencia génica relativamente más pronto que otros virus, y se utilizaron en primer lugar con éxito para el marcado génico y la transducción del ADNc de la adenosina desaminasa (ADA) en linfocitos humanos. Los retrovirus preferidos incluyen lentivirus. En las formas de realización preferidas, el retrovirus se selecciona de entre el grupo constituido por VIH, VIB y VIS.

Las técnicas de administración "no vírica" que se han utilizado o propuesto para la terapia génica incluyen los complejos ADN-ligando, los complejos adenovirus-ligando-ADN, la inyección directa de ADN, la precipitación con CaPO₄, las técnicas de la pistola genética, la electroporación, los liposomas y la lipofección. Un experto en la materia utiliza extensamente cualquiera de estos procedimientos y serían adecuados para su utilización en la presente invención. Un experto en la materia dispone de otros procedimientos adecuados, y debe entenderse que la presente invención puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de los procedimientos de transfección disponibles. Los expertos en la materia han utilizado varias de dichas metodologías con éxito variable. La lipofección puede realizarse encapsulando una molécula de ADN aislada en el interior de una partícula liposómica y poniendo en contacto la partícula liposómica con la membrana celular de la célula diana. Los liposomas son partículas coloidales, de automontaje en las que una bicapa del lípido, compuesta por moléculas anfífilas tales como la fosfatidilserina o la fosfatidilcolina, encapsula una parte del medio circundante de modo que la bicapa de lípido rodea un interior hidrófilo. Los liposomas unilaminares o polilaminares pueden construirse de modo que el interior contenga un producto químico deseado, fármaco, o, como en la presente invención, una molécula de ADN aislada.

Las células pueden transfectarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Las células pueden transfectarse como células primarias aisladas de un paciente o una estirpe celular procedente de células primarias, y no son necesariamente autólogas para el paciente al que se administran las células finalmente. Después de la transfección *ex vivo* o *in vitro*, las células pueden ser implantadas en un hospedador.

Con objeto de obtener la transcripción del ácido nucleico de la presente invención en una célula diana, se utiliza una zona reguladora de la transcripción que puede conducir la expresión génica en la célula diana. La zona reguladora

de la transcripción puede comprender un elemento activador, potenciador, silenciador o represor y está funcionalmente asociado con el ácido nucleico de la presente invención. Preferentemente, la zona reguladora de la transcripción conduce la expresión génica de alto nivel en la célula diana. Las zonas reguladoras de la transcripción adecuadas para su utilización en la presente invención incluyen pero no se limitan al potenciador/activador precoz inmediato citomegalovirus (CMV) humano, al potenciador/activador precoz de SV40, al activador de poliomavirus JC, al activador de albúmina, a PGK y al activador de α -actina acoplado al potenciador de CMV.

Los vectores de la presente invención pueden construirse utilizando técnicas recombinantes normalizadas ampliamente disponibles para un experto en la materia. Dichas técnicas pueden encontrarse en las referencias habituales de la biología molecular tal como Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), D. Goeddel, ed., *Gene Expression Technology*, Methods in Enzymology series, vol. 185, Academic Press, San Diego, CA (1991), e Innis, *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* Academic Press, San Diego, CA (1990).

La administración de un polipéptido o de un ácido nucleico de la presente invención a una célula diana *in vivo* puede llevarse a cabo utilizando alguna de las diversas técnicas bien conocidas por los expertos en la materia.

Los vectores de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, por atomización para inhalación, por vía rectal o tópica en las formulaciones de la unidad de dosificación que contienen portadores, adyuvantes y vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables. El término parenteral tal como se utiliza en la presente memoria incluye las técnicas subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, de infusión o por vía intraperitoneal. Los supositorios para administración rectal del fármaco pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado tal como manteca de coco y polietilenglicoles que son sólidos a las temperaturas ordinarias pero líquidos a la temperatura rectal y por consiguiente se mezclarán en el recto y liberarán el fármaco.

El régimen de dosificación para tratar un trastorno o una enfermedad con los vectores de la presente invención y/o las composiciones de la presente invención se basa en varios factores, incluyendo el tipo de enfermedad, la edad, el peso, el sexo, el estado clínico del paciente, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración y el compuesto específico empleado. De este modo, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero puede determinarse de forma rutinaria utilizando procedimientos normalizados.

Los compuestos farmacéuticamente activos de la presente invención pueden procesarse según los procedimientos convencionales de farmacia para producir composiciones medicinales o agentes para la administración a pacientes, incluyendo seres humanos y otros mamíferos. Para la administración oral, la composición farmacéutica puede estar en forma, por ejemplo, de líquido, en una inserción ocular, una cápsula, un comprimido o una suspensión. La composición farmacéutica se prepara preferentemente en forma de una unidad de dosificación que con presenta una cantidad dada de agente activo. Por ejemplo, ésta puede contener una cantidad de vector desde aproximadamente 10^3 a 10^{15} partículas víricas, preferentemente desde aproximadamente 10^6 a 10^{12} partículas víricas. Una dosis diaria adecuada para un ser humano u otro mamífero puede variar ampliamente dependiendo de la enfermedad del paciente y de otros factores, pero, una vez más, puede determinarse utilizando procedimientos de rutina. La administración puede ser mediante inyección del agente activo en forma de una composición junto con vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados tales como solución salina, dextrosa o agua.

Aunque los ácidos nucleicos y/o los vectores de la invención pueden administrarse como el único agente farmacéutico activo, pueden utilizarse también en combinación con uno o más vectores de la invención u otros agentes. Cuando se administran en combinación, los agentes terapéuticos pueden formularse como composiciones independientes que se dan a la misma vez o en diferentes veces, o los agentes terapéuticos pueden administrarse como una única composición.

El polipéptido de la presente invención puede también utilizarse en combinación con un vehículo farmacéuticamente adecuado. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo incluye pero no se limita a solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La formulación debería seguir el modo de administración.

La invención proporciona también un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Asociado a dicho(s) recipiente(s) puede estar un prospecto en la forma prescrita por la agencia gubernamental que regula la preparación, utilización o venta de los productos farmacéuticos o biológicos, cuyo prospecto refleja la aprobación por la agencia de la preparación, utilización o venta para la administración humana. Además, el polipéptido de la presente invención puede ser empleado junto con otros compuestos terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de manera conveniente, tal como por las vías intraocular, colirios y generalizada. Las cantidades y regímenes de dosificación de los polipéptidos derivados de la ARNt sintetasa administradas a un paciente dependerán de numerosos factores, tales como del modo de administración, de la naturaleza de la enfermedad en tratamiento, del peso corporal del paciente en tratamiento y del criterio del médico que receta. Generalmente hablando, el polipéptido se administra en dosis terapéuticamente eficaces de por lo menos aproximada-

ES 2 318 063 T3

mente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal. Preferentemente, la dosificación es de aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal al día, teniendo en cuenta la frecuencia, las vías de administración, los síntomas, etc.

5 Puede utilizarse terapia angioestática con TrpRS para combatir la actividad angiogénica de factores endógenos y exógenos angiogénicos y para evitar el desarrollo adicional o incluso mejorar los tumores sólidos, ya que la angiogénesis y la neovascularización son etapas esenciales en el desarrollo del tumor sólido. Dichas terapias pueden utilizarse también para tratar la artritis reumatoide, la psoriasis y la retinopatía diabética que se caracterizan todas por angiogénesis anormal.

10 Se proporcionan composiciones que contienen cantidades y concentraciones terapéuticamente eficaces de vectores para la administración de adenovirus recombinante para la administración de productos génicos terapéuticos a células que expresan un receptor específico. Estas células incluyen las células del ojo. Son de particular interés las células fotorreceptoras del ojo. La administración puede efectuarse por cualquier medio mediante el cual se efectúa la puesta en contacto con los fotorreceptores. Para proporcionar acceso a las células fotorreceptoras, los medios preferibles de administración incluyen, pero no se limitan a, la inyección subretiniana o la inyección intravítrea.

15 Las composiciones víricas recombinantes pueden formularse también para la implantación en el interior de la cámara anterior o posterior del ojo, preferentemente en la cavidad vítrea, en las formulaciones de liberación prolongada, tal como adsorbidas a soportes biodegradables, incluyendo esponjas de colágeno o en liposomas. Las formulaciones de liberación prolongada pueden formularse para la administración de dosis múltiples, de modo que durante un periodo seleccionado de tiempo, tal como un mes o hasta aproximadamente un año, se administran varias dosis. De este modo, por ejemplo, pueden prepararse liposomas de modo que se administra en una inyección un total de aproximadamente dos hasta aproximadamente cinco o más veces la dosis individual.

25 Los vectores se formulan en un vehículo oftalmológicamente aceptable para la administración intraocular, preferentemente intravítrea, en un volumen de entre aproximadamente 0,05 ml y 0,15 ml, con preferencia aproximadamente 0,05 y 0,1 ml.

30 Las composiciones pueden suministrarse en un vial esterilizado sellado que representa una cantidad del agente activo que durante la administración intraocular libera una cantidad suficiente de partículas víricas a los fotorreceptores en un volumen de aproximadamente 50 a 150 μl , que representa por lo menos aproximadamente 10^7 , más preferentemente por lo menos aproximadamente 10^8 unidades formadoras de placa en dicho volumen. Por lo general, los viales contendrán, por lo tanto, aproximadamente 0,15 ml de la composición.

35 Para preparar dichas composiciones, las partículas víricas se dializan en un vehículo adecuado oftalmológicamente aceptable o las partículas víricas pueden concentrarse y/o mezclarse con éstas. La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión o emulsión. Además, las partículas víricas pueden formularse como único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o pueden combinarse con otros agentes activos para el trastorno específico tratado.

40 Para la administración por inyección intraocular o mediante colirios, los vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina equilibrada (BSS), solución de lactato de Ringer y soluciones que contienen agentes espesantes y disolventes, tales como glucosa, polietilenglicol y polipropilenglicol y mezclas de los mismos. Las suspensiones liposómicas pueden ser también adecuadas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Éstas pueden prepararse según los procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Los vehículos adecuados oftalmológicamente aceptables son conocidos. Las soluciones o mezclas deseadas para su utilización oftálmica pueden formularse como soluciones isotónicas del 0,01% al 10%, pH aproximadamente entre 5 y 7, con sales apropiadas (véase, p. ej., la patente U.S. n° 5.116.868, que describe composiciones típicas de soluciones oftálmicas de irrigación y soluciones para aplicación local). Dichas soluciones, que tienen un pH ajustado a aproximadamente 7,4, tienen, por ejemplo, cloruro sódico 90-100 mM, fosfato potásico dibásico 4-6 mM, fosfato sódico dibásico 4-6 mM, citrato sódico 8-12 mM, cloruro de magnesio 0,5-1,5 mM, cloruro cálcico 1,5-2,5 mM, acetato sódico 15-25 mM, D,L- β -hidroxibutirato sódico 10-20 mM y glucosa 5-5,5 mM.

55 Las composiciones pueden prepararse con vehículos que protegen el agente activo contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como formulaciones de liberación lenta o recubrimientos. Dichos vehículos incluyen formulaciones de liberación controlada, tales como, pero sin limitarse a, sistemas de administración microencapsulados y polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como el acetato de vinilileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, poliortoésteres, ácido poliláctico y otros tipos de implantes que pueden colocarse directamente en la cámara anterior o posterior o en la cavidad vítrea del ojo. Las composiciones pueden administrarse en granulados, tal como granulados ELVAX® (resina del copolímero de acetato de vinilileno, DuPont).

60 Las suspensiones liposómicas, incluyendo los liposomas dirigidos al tejido, pueden ser también adecuadas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, pueden prepararse formulaciones liposómicas por procedimientos conocidos por los expertos en la materia (véase, p. ej. Kimm *et al.*, *Bioch. Bioph. Acta* 728:339-398 (1983); Assil *et al.*, *Arch. Ophthalmol.* 105:400 (1987); y en la patente U.S. n° 4.522.811). Las partículas víricas pueden estar encapsuladas en el interior de la fase acuosa de los sistemas liposómicos.

Los materiales o agentes activos pueden mezclarse también con otros materiales activos, que no proporcionan la acción deseada o con materiales que complementan la acción deseada o que tienen otra acción, incluyendo los materiales viscoelásticos, tal como el ácido hialurónico, que se comercializa con la marca comercial HEALON® (Pharmacia, Inc.), que es una solución de alto peso molecular (P.M.) de aproximadamente la fracción de 3 millones de hialuronato sódico (véase, p. ej., las patentes U.S. n° 5.292.362, n° 5.282.851, n° 5.273.056, n° 5.229.127, n° 4.517.295 y n° 4.328.803) y las resinas comercializadas con la marca comercial VISCOAT® (disponible en Alcon Surgical, Inc.), que son (met)acrilatos que contienen flúor, tales como, 1H,1H,2H,2H-heptadecafluorodecilmecrilato (véase, p. ej., las patentes U.S. n° 5.278.126, n° 5.273.751 y n° 5.214.080) y las resinas comercializadas con la marca comercial ORCOLON® (Optical Radiation Corporation, véase, p. ej., la patente U.S. n° 5.273.056) y metilcelulosas, hialuronatos de metilo, poli(acrilamidas y polimetacrilamidas (véase, p. ej., la patente U.S. n° 5.273.751). Los materiales viscoelásticos están presentes generalmente en cantidades que oscilan desde aproximadamente 0,5 a 5,0%, preferentemente entre 1 y 3% en peso del material conjugado y sirven para recubrir y proteger los tejidos tratados. Las composiciones pueden incluir también un colorante, tal como azul de metileno u otros colorantes inertes, de modo que la composición pueda verse cuando se inyecta dentro del ojo. Pueden incluirse agentes activos adicionales.

Las composiciones pueden estar dentro de ampollas, jeringuillas de un solo uso o viales de múltiples o una sola dosis de vidrio, plástico u otro material adecuado. Dichas composiciones contenidas en el interior pueden suministrarse en kits. En particular, en la presente memoria se proporcionan kits que contienen viales, ampollas u otros recipientes, preferentemente viales de un solo uso con una cantidad suficiente de la composición a administrar de aproximadamente 0,100 ml de la misma y agujas de un solo uso, preferentemente agujas de calibre 25-33 con autosellado, o más pequeñas.

Por último, las composiciones pueden estar envasadas como artículos de preparación que contienen material de envasado, por lo general un vial, una composición oftalmológicamente aceptable que con presenta un polipéptido de la presente invención y una etiqueta que indica la utilización terapéutica de la composición.

También se suministran kits para la puesta en práctica de las utilizaciones en la presente memoria. Los kits contienen uno o más recipientes, tal como viales sellados, con composición suficiente para administración de una sola dosis, y una o más agujas, tal como agujas de calibre 25-33 o más pequeñas con autosellado, preferentemente agujas de calibre 33 o más pequeñas, con jeringuillas calibradas con precisión u otros dispositivos de administración calibrados con precisión, adecuados para la inyección intravítrea.

La administración de la composición es preferentemente por inyección intraocular, aunque pueden ser eficaces otros modos de administración, si la cantidad suficiente del compuesto consigue ponerse en contacto con la cavidad vítrea. La inyección intraocular puede efectuarse por inyección intravítrea, inyección en el humor acuoso o inyección en las capas externas del ojo, tal como la inyección subconjuntiva o la inyección subtenón o mediante aplicación tópica en la córnea, si se utiliza una formulación penetrante.

Para cualquier paciente en concreto, los regímenes específicos de dosificación deberían ajustarse a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o que supervisa la administración de los virus recombinantes. La concentración e intervalos de cantidades publicados en la presente memoria son únicamente a título de ejemplo y no pretenden limitar el alcance o la puesta en práctica de las utilizaciones reivindicadas.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos de formas de realización específicas de la invención, y de varias utilizaciones de la misma. Se proporcionan a título ilustrativo y explicativo solamente, pero no deben considerarse limitativos.

Ejemplo 1

50 *Preparación de TrpRS recombinante exenta de endotoxina*

Se preparó de la forma siguiente TrpRS humana recombinante exenta de endotoxina. Se prepararon plásmidos que codifican la TrpRS completa (restos de aminoácidos 1 a 471 de la SEC. ID. n°: 1) o la TrpRS truncada, denominada en lo sucesivo T2 (SEC. ID. n°: 12), constituida esencialmente por los restos 94 a 471 de la SEC. ID. n°: 1 (es decir, los restos 94 a 471 de la TrpRS completa) y una segunda TrpRS truncada, denominada en lo sucesivo T1 (SEC. ID. n°: 13), constituida esencialmente por los restos 71 a 471 de la SEC. ID. n°: 1. Cada plásmido también codificó una etiqueta C-terminal que comprende seis restos de histidina (p. ej. los restos de aminoácidos 472 a 484 de la SEC. ID. n°: 1), y un resto inicial de metionina. La T1 activada por His₆ presenta la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. n°: 5, mientras que la T2 activada por His₆ presenta la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. n°: 7.

Los plásmidos anteriores se introdujeron en la cepa BL 21 (DE 3) de *E. coli* (Novagen, Madison, WI). Se preparó asimismo para su utilización la EMAPII madura humana, que codifica también una etiqueta C-terminal de seis restos de histidina. Se provocó la sobreexpresión de TrpRS recombinante tratando las células con β -D-tiogalactopiranosido de isopropilo durante 4 horas. Se lisaron las células a continuación y se purificaron las proteínas procedentes del sobrenadante en columnas de afinidad de níquel HIS-BIND® (Novagen) según el protocolo sugerido por el fabricante. Después de la purificación, se incubaron las proteínas TrpRS con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía ZnSO₄ 1 μ M y a continuación se eliminó el Zn²⁺ libre (Kisselev *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 120:511-17 (1981)).

Se eliminó la endotoxina procedente de las muestras de proteína por separación de fases utilizando Triton X-114 (Liu *et al.*, *Clin. Biochem.* 30:455-63 (1997)). Se determinaron las muestras de proteína que contenían menos de 0,01 unidades de endotoxina por ml utilizando un ensayo de coagulación en gel E-TOXATO® (Sigma, St. Louis, MO). Se determinó la concentración de proteínas mediante el ensayo Bradford (BioRad, Hércules, CA) utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón.

Ejemplo 2

Escisión de TrpRS humana mediante PMN elastasa

La escisión de TrpRS humana completa fue examinada con PMN elastasa. Se trató la TrpRS con PMN elastasa en PBS (pH 7,4) a una proporción de proteasa:proteína de 1:3000 durante 0, 15, 30 ó 60 minutos. Después de la escisión, se analizaron las muestras en geles de SDS al 12,5%-poliacrilamida. La escisión con PMN elastasa de una TrpRS completa de aproximadamente 53 kDa, codificada por los nucleótidos 3428 a 4738 de la SEC. ID. n°: 2 del ADN) generó un fragmento mayor de aproximadamente 46 kDa (SEC. ID. n°: 5, T1 con la etiqueta de histidina C-terminal) y un fragmento menor de aproximadamente 43 kDa (SEC. ID. n°: 7, teniendo T2 la etiqueta de histidina C-terminal).

El análisis por inmunotransferencia Western con antibióticos dirigidos contra la etiqueta His₆ del terminal carboxilo de la proteína recombinante TrpRS puso de manifiesto que ambos fragmentos poseían la etiqueta His₆ en su terminal carboxilo. De este modo, solamente el terminal amino de dos fragmentos de TrpRS se había truncado. Las secuencias con terminal amino de los fragmentos de TrpRS se determinaron por degradación de Edman utilizando un secuenciador modelo 494 de ABI. El secuenciado de estos fragmentos demostró que las secuencias con terminal amino eran S-N-H-G-P (SEC. ID. n°: 8) y S-A-K-G-I (SEC. ID. n°: 9), lo que indica que los restos con terminal amino de los fragmentos de TrpRS mayor y menor estaban situados en las posiciones 71 y 94, respectivamente de la TrpRS completa. En la Figura 1 se resumen estos montajes de de TrpRS humana. Las secuencias con la característica -HVGH- (SEC. ID. n°: 10) y -KMSAS- (SEC. ID. n°: 11), se presentan en recuadros.

Se analizó la actividad angiostática de los fragmentos mayor y menor de TrpRS en ensayos de angiogénesis. Las formas recombinantes de los fragmentos mayor y menor de TrpRS SEC. ID. n°: 5 y SEC. ID. n°: 7 cada una con una etiqueta de histidina con terminal C (restos de aminoácidos 472 a 484 de la SEC. ID. n°: 1) se utilizaron en estos ensayos. Ambos fragmentos de TrpRS eran capaces de inhibir la angiogénesis.

Ejemplo 3

Fragmentos truncados de TrpRS presentan efecto angiostático potente para la angiogénesis retiniana

Se examinó la actividad angiostática de las formas truncadas procedentes de la triptofanil-ARNt sintetasa (TrpRS, 53 kDa, SEC. ID. n°: 1), en un modelo de angiogénesis retiniana de ratón después del nacimiento. Friedlander *et al.*, *Abstracts* 709-884 y 714-889, IOVS 41(4):138-139 (15 de marzo de 2000) han descrito que la angiogénesis retiniana después del nacimiento procede en etapas en el ratón. En la presente memoria se describe un procedimiento de ensayo de inhibición de la angiogénesis aprovechando esta vascularización retiniana en etapas.

Se prepararon la mini-TrpRS recombinante exenta de endotoxina (variante de corte y empalme de 48 kDa de TrpRS activada por histidina; SEC. ID. n°: 3) y T2 (producto de la escisión de 43 kDa de TrpRS activada por histidina; SEC. ID. n°: 7) como proteínas recombinantes. Estas proteínas se inyectaron por vía intravítrea en ratones Balb/C recién nacidos los días 7 u 8 después del nacimiento (P) y se recogieron las retinas en P12 o P13. El anticuerpo del colágeno IV y el anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína se utilizaron para observar los vasos en preparaciones completas montadas de retina. Se evaluó la actividad antiangiogénica por examen al microscópico confocal basándose en el efecto de las proteínas inyectadas en la formación del plexo profundo, externo y vascular. La inyección intravítrea y el aislamiento de la retina se realizó con un microscopio de disección (SMZ 645, Nikon, Japón). Se creó una fisura en el párpado en los ratones del día 7 después del nacimiento (P7) con una cuchilla fina para exponer el glóbulo a la inyección de T2 (5 pmoles) o de TrpRS (5 pmoles). Se inyectaron las muestras (0,5 µl) con una jeringuilla provista de una aguja del calibre 32 (Hamilton Company, Reno, NV). La inyección se practicó entre el ecuador y el limbo de la córnea; durante la inyección la posición de la punta de la aguja se controló por observación directa para determinar que estaba en la cavidad vítrea. Los ojos con cristalinos inducidos con la aguja o daño en la retina se excluyeron del estudio. Tras la inyección, los párpados se volvieron a colocar para cerrar la fisura.

El día 12 después del nacimiento (P12), se practicó la eutanasia a los animales y se extrajeron los núcleos oculares. Después de 10 minutos en paraformaldehído al 4% (PFA), se separaron la córnea, los cristalinos, la esclerótica y el humor vítreo mediante una incisión del limbo. Se preparó la retina aislada por tinción mediante impregnación en metanol durante 10 minutos en hielo, seguido de bloqueo en suero bovino fetal al 50% (Gibco, Grand Island, NY) con suero de cabra normal al 20% (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) en PBS durante 1 hora en hielo. Se observaron específicamente los vasos sanguíneos tiñendo la retina con un anticuerpo de colágeno IV anti-ratón de conejo (Chemicon, Temecula, CA) diluido 1:200 en tampón de bloqueo durante 18 h a 4°C. Un anticuerpo de IgG anti-conejo de cabra conjugado con ALEXA FLUOR® 594 (Molecular Probes, Eugene, OR) (dilución 1:200 en tampón de bloqueo) se incubó con la retina durante 2 h a 4°C. Las retinas se montaron con medio M de montaje de fundido lento (Molecular Probes, Eugene, OR).

Se evaluó la actividad angioestática basándose en el grado de angiogénesis en la capa vascular retiniana profunda y más externa (capa secundaria) que se forma entre P8 y P12. Se evaluó el aspecto de la red de vasos sanguíneos más internos (capa primaria) para el desarrollo normal y los signos de toxicidad. Ninguno de los montajes de proteínas utilizado en este ejemplo produjo efectos desfavorables en la capa primaria.

La Fig. 2 proporciona una representación fotomicrográfica de la capacidad de T2 para inhibir la vascularización de la red secundaria profunda de la retina del ratón. En la Fig. 2, la fila A presenta la red vascular de la retina expuesta a TrpRS, la fila B presenta la red vascular de una retina expuesta a mini-TrpRS y la fila C presenta la red vascular de una retina expuesta al polipéptido T2 de la presente invención. La primera columna (izquierda) presenta la red superficial primaria y la segunda columna presenta la red profunda secundaria. Como es evidente a partir de la Fig. 2, ninguno de los polipéptidos afectó la red superficial primaria, mientras que solamente T2 inhibió significativamente la vascularización de la red profunda secundaria.

La mayoría de los ojos tratados con PBS presentaban un desarrollo vascular retiniano normal, pero la inhibición completa de la capa vascular más externa se observó en aproximadamente el 8,2% (n=73) de los ojos tratados. La inhibición completa de la red externa se observó en el 28% de los ojos tratados con mini-TrpRS (0,5 mg/ml) (n=75). La forma truncada, más pequeña (T2) fue un inhibidor de angiogénesis mucho más potente a una dosis dependiente; el 14,3% se inhibieron completamente después del tratamiento con 0,1 mg/ml de T2 (n=14), el 40% después del tratamiento con 0,25 mg/ml (n=20) y el 69,8% se inhibió completamente después de 0,5 mg/ml (n=53). Los datos para los tratamientos con 0,5 mg/ml se presentan gráficamente en la Fig. 3. Los extractos de retina de ratón contienen una proteína con la misma masa molecular aparente e inmunoreactividad que la mini-TrpRS humana, analizada por SDS-PAGE e inmunotransferencia Western. La TrpRS de ratón y humana completas comparten aproximadamente el 88% de identidad de aminoácidos y contienen 475 y 471 aminoácidos respectivamente. Las formas truncadas de TrpRS especialmente T2, tienen un potente efecto angioestático sobre el desarrollo vascular retiniano.

Ejemplo 4

Ensayo de angiogénesis con matrigel

Se utilizó un ensayo de angiogénesis con matrigel en ratón para examinar la actividad angioestática de T2 (SEC. ID. n°: 7) según los procedimientos descritos por Brooks *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, 129: 257-269 (1999) y Eliceiri *et al.*, *Mol. Cell*, 4: 915-924 (1999). Se realizó tal como se describe con las modificaciones siguientes. Se implantaron 400 μ l de matrigel sin factor de crecimiento (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) que contenía VEGF 20 nM por vía subcutánea en ratones wehi atímicos. Se probó inicialmente la actividad angioestática de T2 incluyendo T2 2,5 μ M en el tampón de matrigel. Se determinó la potencia incluyendo varias concentraciones de T2 en el tapón. El día 5, se inyectó a los ratones por vía intravenosa Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia I con lectina con unión endotelial marcada con fluoresceína, isolectina B4 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se reseccionaron los tapones de matrigel. Se determinó cuantitativamente el contenido de fluoresceína de cada tapón por análisis espectrofotométrico después de disgregar el tapón en tampón RIPA (fosfato sódico 10 mM, pH 7,4, cloruro sódico 150 mM, Nonidet P-40 al 1%, desoxicolato sódico al 0,5% y dodecil sulfato sódico al 0,1%).

Ejemplo 5

Localización de la fijación de T2 en la retina

Para evaluar la absorción y localización de T2 inyectada en la retina, se inyectó en el humor vítreo del ojo T2 marcada con fluoresceína (ALEXA[®] 488, Molecular Probes, Inc., Eugene OR) el día 7 después del nacimiento (P7). Se recogieron las esferas en P8 y P12 y se fijaron en PFA al 4% durante 15 min. Se disecaron más las retinas exentas de tejido adherente no retiniano y se colocaron en PFA al 4% durante la noche a 4°C y a continuación se empaparon en medio (TISSUE-TEK[®] O.C.T., Sakura Fine Technical Co., Japón) en nieve carbónica. Se rehidrataron las secciones del criostato (10 micras) con PBS y se bloquearon con BSA al 5%, suero de cabra normal al 2% en PBS. Se observaron los vasos sanguíneos con anticuerpo de colágeno IV anti-ratón tal como se describió anteriormente. Se utilizó VECTASHIELD[®] que contenía mancha nuclear DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para montar los tejidos con un cubreobjetos.

Alternativamente, se incubaron secciones de retina no teñidas con TrpRS completa marcada con fluoresceína 200 nM o T2 marcada con fluoresceína en tampón de bloqueo durante la noche a 4°C. Se lavaron las secciones seis veces durante 5 minutos cada una en PBS, seguido de incubación con 1 μ g/ml de DAPI durante 5 minutos para observación de los núcleos. El bloqueo previo con T2 sin marcar se realizó incubando T2 1 μ M sin marcar durante 8 horas a 4°C antes de la incubación con T2 marcada con fluoresceína. Se examinaron las retinas con un microscopio confocal multifotón MRC 1024 de BioRad. Se produjeron imágenes vasculares en 3-D de una serie de imágenes de la serie Z utilizando el programa informático Confocal Assistant (BioRad, Hércules, CA).

Potencia angioestática de T2 en el ensayo con tapón matrigel en ratón. Los inventores examinaron T2 (SEC. ID. n°: 7) para determinar si había actividad angioestática, aun cuando se había perdido la actividad de aminoacilación. Se utilizó el ensayo con matrigel en ratón para examinar la actividad angioestática de T2 *in vivo*. VEGF₁₆₅ provoca el desarrollo de vasos sanguíneos en el tapón de matrigel en ratón. Cuando se añadió T2 al matrigel junto con VEGF₁₆₅, se bloqueó la angiogénesis en función de la dosis con una IC₅₀ de 1,7 nM como se muestra en la Fig. 4.

T2 marcada con fluoresceína se localiza en los vasos sanguíneos de la retina. Con objeto de observar la localización intraocular de T2 (SEC. ID. n°: 7), los inventores examinaron la distribución de T2 marcada con fluoresceína después de la inyección intravenosa el 7º día tras el nacimiento. Se aislaron las retinas al día siguiente, se seccionaron y examinaron utilizando microscopía confocal. La distribución de la proteína inyectada se limitó a los vasos sanguíneos. Se confirmó esta localización mediante T2 marcada por tinción conjunta se trataron los ojos con anticuerpo anti-colágeno IV marcado con fluoresceína (ALEXA® 594) (datos no mostrados). Cinco días después de la inyección de T2 marcada con fluoresceína (en P12), la fluorescencia verde de la T2 marcada era todavía visible (Fig. 5A). En estas retinas, no se observó la capa vascular secundaria en P12, lo que indica que la T2 marcada con fluoresceína conservaba actividad angioestática comparable a T2 sin marcar. Las retinas inyectadas en T7 con TrpRS completa marcada con fluoresceína desarrolló una capa vascular secundaria mediante P12 pero no se observó tinción vascular (Fig. 5B). En la Fig. 5, las proteínas marcadas con fluoresceína son verdes, los vasos marcados con colágeno son rojos y los núcleos son azules.

Para evaluar más las propiedades de fijación de la T2 marcada, se tiñeron retinas normales de recién nacido con T2 marcada con fluoresceína. En estas condiciones, T2 marcada con fluoresceína solo se unió a los vasos sanguíneos (Fig. 5C). La fijación era específica ya que se bloqueó por incubación previa con T2 sin marcar (datos no mostrados). No se observó tinción de vasos retinianos cuando se aplicó a las retinas TrpRS completa marcada con fluoresceína (Fig. 5D), que concuerda con la ausencia de actividad angioestática de la enzima completa.

Como se muestra en la Fig. 5, T2 marcada con fluoresceína es angioestática y se localiza en los vasos sanguíneos retinianos. Se inyectaron (0,5 µl, por vía intravenosa) el 7º día después del nacimiento (P7) de T2 marcada con fluoresceína (Fig. 5A) o TrpRS completa (Fig. 5B). Se recogieron las retinas en P8 y se tiñeron con un anticuerpo anti-colágeno IV y tinción nuclear de API. T2 marcada (flecha superior que apunta al vaso en la Fig. 5A) se localizó en los vasos sanguíneos en la red superficial primaria (1º). Obsérvese que la red profunda secundaria está completamente ausente (2º). Aunque tanto las capas vasculares primarias (1º) como secundarias (2º) están presentes en los ojos inyectados con TrpRS completa marcada con fluoresceína (flechas en la Fig. 5B), no se observó marcado.

En una serie independiente de experimentos, se tiñeron secciones congeladas de retinas P15 con T2 marcada con fluoresceína (Fig. 5C) o TrpRS completa marcada con fluoresceína (Fig. 5D) y se diagnosticaron por la imagen en el microscopio de láser de escaneado confocal. La T2 marcada se localizó selectivamente en los vasos sanguíneos y aparece como un vaso verde brillante que penetra las capas vasculares de la retina primarias y secundarias justo por debajo de la etiqueta "2" en la Fig. 5C. No se observó tinción con TrpRS completa (Fig. 5D).

La TrpRS completa con presenta un único dominio con terminal NH₂ y carece de actividad angioestática. Eliminando parte o todo este dominio completo se pone de manifiesto una proteína con actividad angioestática. Las estructuras responsables de actividad angioestática de T2 parecen estar contenidas dentro del dominio que se une al nucleótido del pliegue Rossmann del núcleo. El dominio con terminal NH₂, que puede ser eliminado mediante corte y empalme alternativo o por proteólisis, puede regular la actividad angioestática de TrpRS, posiblemente poniendo de manifiesto una secuencia de fijación necesaria para la angiostasis que es inaccesible en TrpRS completa.

La angiogénesis provocada por VEGF en el modelo matrigel de ratón fue inhibida completamente por T2 ya que era angiogénesis fisiológica en la retina del recién nacido. Resulta interesante que el efecto antiangiogénico más potente de los fragmentos de TrpRS *in vitro* y en CAM y en los modelos matrigel se observa en la angiogénesis estimulada por VEGF. Los resultados de la angiogénesis de la retina de ratón recién nacido son coherentes con un enlace entre la angiogénesis estimulada por VEGF y los efectos angioestáticos de los fragmentos de TrpRS; la angiogénesis de la retina en este sistema puede ser dirigida por VEGF. Además, la inhibición observada en el modelo de retina era específica para los vasos recién desarrollados. Los vasos de la capa vascular primaria preexistentes (en el momento de la inyección) estaban inalterados por el tratamiento. Aunque el mecanismo de la actividad angioestática de T2 no es conocido, la localización específica de T2 para el sistema vascular endotelial retiniano y el efecto selectivo de T2 en los vasos sanguíneos recién desarrollados sugiere que T2 puede funcionar mediante un receptor celular endotelial expresado en las células proliferantes o migrantes. La comprensión adicional del mecanismo de actividad angioestática de T2 requiere la identificación del receptor celular aplicable.

Una variedad de tipos de células que producen, estimulación en el interferón y, la mini-TrpRS angioestática también producen factores angioestáticos tales como IP-10. De este modo, estos resultados aumentan la posibilidad de una función para TrpRS en trayectorias normales, fisiológicamente aplicables de la angiogénesis. Otra proteína-pro-EMAPII (p43) celular omnipresente presenta dos funciones aparentemente no relacionadas similares a las descritas en la presente memoria para TrpRS. La pro-EMAPII ayuda a la traducción de la proteína asociándose al complejo multisintetasa de las aminoacil ARNt sintetasas de mamífero. Es procesada y segregada como EMAPII y se ha sugerido una función para EMAPII como mediador angioestático durante el desarrollo del pulmón.

De este modo, T2 puede utilizarse en el remodelado angiogénico fisiológicamente aplicable observado en condiciones normales o patológicas. En la angiogénesis normal, T2 puede ayudar a establecer zonas avasculares fisiológicamente importantes presentes en algunos órganos tales como la zona avascular de la fovea de la retina central. La angiogénesis patológica puede producirse si la escisión de TrpRS completa se inhibía, conduciendo a un sobrecrecimiento de los vasos.

ES 2 318 063 T3

En las enfermedades oculares, la neovascularización puede conducir a la pérdida catastrófica de la visión. Estos pacientes pueden recibir potencialmente gran beneficio de la inhibición terapéutica de la angiogénesis. El factor de crecimiento endotelial vascular ha estado asociado a la neovascularización y al edema macular en la retina, aunque se cree que otros estímulos angiogénos también desempeñan funciones en la angiogénesis retiniana. Los inventores han observado una asociación entre la angiogénesis estimulada por VEGF y la potente actividad angioestática de los fragmentos de TrpRS, haciendo a estas moléculas útiles en el tratamiento de las retinopatías hipóxicas, y otras, proliferantes. No se ha informado en la bibliografía de un agente antiangiogénico que inhiba completamente el 70% del tiempo la angiogénesis, como la hace la T2 de la presente invención (Fig. 5). Otra ventaja de los fragmentos de TrpRS es que representan antiangiogénos naturales y, por consiguiente, potencialmente no inmunogénos. De este modo, estas moléculas pueden ser liberadas por las células dirigidas o por terapia a base de vector vírico. Debido a que muchos pacientes con enfermedades neovasculares oculares se han asociado a la enfermedad isquémica generalizada, es deseable el tratamiento antiangiogénico local con células modificadas genéticamente o vectores víricos colocados directamente en el ojo.

Además del tratamiento de las retinopatías angiogénas, los fragmentos de TrpRS de la presente invención, particularmente T2 y los fragmentos que inhiben la angiogénesis de la misma, pueden inhibir también el crecimiento del tumor sólido impidiendo la vascularización del tumor. Los fragmentos de TrpRS de la presente invención bloquean la proliferación inducida por VEGF y la quimiotaxia de las células endoteliales *in vitro*, y de este modo son útiles en el tratamiento de cualquier patología que implique la proliferación y vascularización de las células endoteliales no deseadas.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado, soluble en agua, constituido por la secuencia de restos de aminoácidos

5

SAKGIDYDKL IVRFGSSKID KELINRIERA TGQRPHHFLR RGIFFSHRDM
 NQVLDAYENK KPFYLYTGRG PSSEAMHVGH LIPFIFTKWL QDVFNVPLVI
 10 QMTDDEKYLW KDLTLDQAYG DAVENAKDII ACGFDINKTF IFSDLDYMG
 SSGFYKNVVK IQKHVTFNQV KGIFGFSDSD CIGKISFPPI QAAPSFSNSF
 PQIFRDRTDI QCLIPCAIDQ DPYFRMTRDV APRIGYPKPA LLHSTFFPAL
 15 QGAQTKMSAS DPNSSIFLTD TAKQIKTKVN KHAFSGGRDT IEEHRQFGGN
 CDVDVSFMYL TFFLEDDDKL EQIRKDYTSG AMLTGELKKA LIEVLQPLIA
 EHQARRKEVT DEIVKEFMTP RKLSFDFQ SEC ID nº 12

20

o una angiogénesis que inhibe su fragmento;

presentando dicho polipéptido aislado un tamaño no superior a 45 kilodaltons.

25

2. Polipéptido aislado según la reivindicación 1, que es un fragmento inhibidor de angiogénesis que puede inhibir la neovascularización ocular.

30

3. Polipéptido aislado según la reivindicación 1, que es un fragmento inhibidor de angiogénesis que puede inhibir la neovascularización ocular y que incluye por lo menos una de las secuencias de identificación de restos de aminoácidos HVGH (SEC. ID. nº: 10) y KMSAS (SEC. ID. nº: 11).

35

4. Polipéptido aislado según la reivindicación 1, que es un fragmento inhibidor de angiogénesis que puede inhibir la neovascularización ocular y que incluye la secuencia de identificación de restos de aminoácidos HVGH (SEC. ID. nº: 10).

5. Polipéptido aislado según la reivindicación 1, que es un fragmento inhibidor de angiogénesis que puede inhibir la neovascularización ocular y que presenta un tamaño inferior a 43 kilodaltons.

40

6. Polipéptido aislado que presenta la secuencia de restos de aminoácidos SEC. ID. nº: 7.

7. Polinucleótido aislado que codifica un polipéptido aislado, soluble en agua según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

45

8. Vector recombinante que comprende el polinucleótido aislado según la reivindicación 7.

9. Célula hospedadora recombinante que incluye el vector según la reivindicación 8.

10. Célula hospedadora recombinante que expresa el polipéptido según la reivindicación 1.

50

11. Utilización de un polipéptido soluble en agua que está constituido por la secuencia de restos de aminoácidos

55

SAKGIDYDKL IVRFGSSKID KELINRIERA TGQRPHHFLR RGIFFSHRDM
 NQVLDAYENK KPFYLYTGRG PSSEAMHVGH LIPFIFTKWL QDVFNVPLVI
 QMTDDEKYLW KDLTLDQAYG DAVENAKDII ACGFDINKTF IFSDLDYMG
 SSGFYKNVVK IQKHVTFNQV KGIFGFSDSD CIGKISFPPI QAAPSFSNSF
 60 PQIFRDRTDI QCLIPCAIDQ DPYFRMTRDV APRIGYPKPA LLHSTFFPAL
 QGAQTKMSAS DPNSSIFLTD TAKQIKTKVN KHAFSGGRDT IEEHRQFGGN
 CDVDVSFMYL TFFLEDDDKL EQIRKDYTSG AMLTGELKKA LIEVLQPLIA
 65 EHQARRKEVT DEIVKEFMTP RKLSFDFQ (SEC ID nº 12)

ES 2 318 063 T3

o un fragmento inhibidor de la neovascularización ocular de la misma para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir la neovascularización ocular en un paciente que comprende administrar dicha composición farmacéutica a dicho paciente en una cantidad que inhiba la neovascularización ocular.

- 5 12. Utilización según la reivindicación 11, en la que la administración se efectúa a diario.
13. Utilización según la reivindicación 11, en la que la administración se efectúa semanalmente.
- 10 14. Utilización según la reivindicación 11, en la que la administración se efectúa mensualmente.
- 15 15. Utilización según la reivindicación 11, en la que la administración se efectúa trimestralmente.
16. Utilización según la reivindicación 11, en la que la administración se efectúa semestralmente.
17. Utilización según la reivindicación 11, en la que se administra al paciente una dosis diaria de polipéptido de 20 a 100 microgramos.
18. Utilización según la reivindicación 11, en la que se administra al paciente una dosis trimestral de polipéptido de 2 a 9 miligramos.
- 20 19. Utilización según la reivindicación 11, en la que la administración se efectúa por suministro intravítreo.
20. Utilización según la reivindicación 11, en la que la administración se efectúa por suministro intraocular.
- 25 21. Utilización según la reivindicación 11, en la que la administración se efectúa mediante un dispositivo de suministro prolongado.
22. Utilización según la reivindicación 11, en la que la administración se efectúa mediante terapia génica.
- 30 23. Utilización según la reivindicación 11, en la que la administración se efectúa por suministro ocular basado en células.
24. Composición angiostática inyectable que comprende un polipéptido constituido por la secuencia de restos de aminoácidos

35

SAKGIDYDKL IVRFGSSKID KELINRIERA TGQRPHHFLR RGIFFSHRDM

NQVLDAYENK KPFYLYTGRG PSSEAMHVGH LIPFIFTKWL QDVFNVPLVI

40 **QMTDDEKYLW KDLTLDQAYG DAVENAKDII ACGFDINKTF IFSDLDYMG**

SSGFYKNVVK IQKHVTFNQV KGIFGFTDSD CIGKISFPAI QAAPSFSNSF

PQIFRDRTDI QCLIPCAIDQ DPYFRMTRDV APRIGYPKPA LLHSTFFPAL

45 **QGAQTKMSAS DPNSSIFLTD TAKQIKTKVN KHAFSGGRDT IEEHRQFGGN**

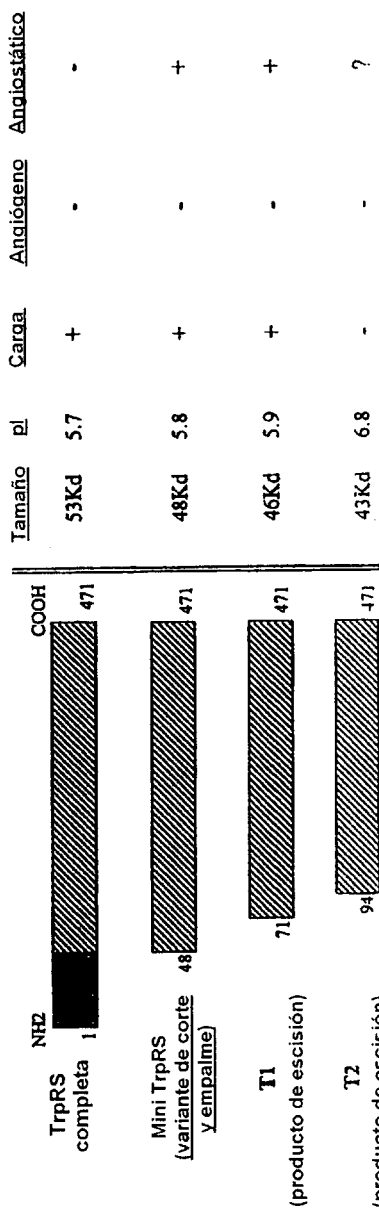
CDVDVSFMYL TFFLEDDDKL EQIRKDYTSG AMLTGELKKA LIEVLQPLIA

50 **EHQARRKEVT DEIVKEFMTP RKLSEDFQ (SEC ID nº 12)**

o un fragmento inhibidor de angiogénesis de la misma y un excipiente acuoso farmacológicamente aceptable, conteniendo la composición el polipéptido en una concentración de por lo menos 0,1 miligramos por mililitro de excipiente acuoso.

- 55 25. Composición angiostática según la reivindicación 24, en la que el polipéptido presenta la secuencia de restos de aminoácidos SEC. ID. nº: 7 o SEC. ID. nº: 12 y está presente en una concentración comprendida en el intervalo de 0,1 a 0,5 miligramos por mililitro de excipiente acuoso.
- 60 26. Kit para inhibir la neovascularización ocular que comprende una cantidad de un polipéptido según la reivindicación 1, suficiente para por lo menos una administración de una sola dosis, envasada en un recipiente sellado adecuado; por lo menos una aguja de jeringuilla de autosellado que presenta un calibre inferior a 33, adecuado para la inyección intravítrea; y por lo menos una jeringuilla calibrada con precisión.
- 65 27. Kit según la reivindicación 26, que comprende además material con información impresa que describe la composición, su procedimiento de administración y cualquier información de seguridad y eficacia requerida tal como puede resultar requerida por las regulaciones gubernamentales.

Resumen de montajes humanos TrpRS



*Nota: Se ha preparado un mutante de cada una de las cuatro proteínas en el que la DLT(205-207) está sustituida por ELR

1 MPNSEPASLL ELFNSIATQG ELVRSLKAGN ASKDEIDS AV KMLVSLKMSY KAAAGEDYKA DCPFGNPAPT **SNHGPD**ATEA
 81 EEDFVDPWTV QTSSAKGIDY DKLIVRFSS KIDKELINRI ERATGQRPFH FLRGGIFFSH RDMNQVLDAY ENKKEFFLYT **T1**
 161 GRGPPSEARMH **VGH**LIPFIFT KWLQDVFNVP LVIQMTDDEK YLWKDLILDQ AYGDAVENAK DIIACGFDIN KTFIFSDDLDY
 241 MGMTSSEYKN VVKIQKHVTF NOVKGIFGFT DSDCIGKISF PAIQAAPSPFS NSFPQIFRDR TDIQCLIPCA IDQDEYFRMT
 321 RDVAPRIGYP KPALLHSTFF PALQGAQT **KM SAS**DPNSSIF LDTAKQIKT KVNKHFSSG RDTIEEHRQF GGNCVDVDSF
 401 MYLTFELEDK DKLEQIRKDY TSGAMLIGEL KKALIEVLOP LIAEHQARRK EVTDEIVKEF MTPRKLSEDF Q

*Nota: Todos son montajes recombinantes y tienen un terminal N Met y un terminal C KLAALAEHHHHH

FIGURA 1

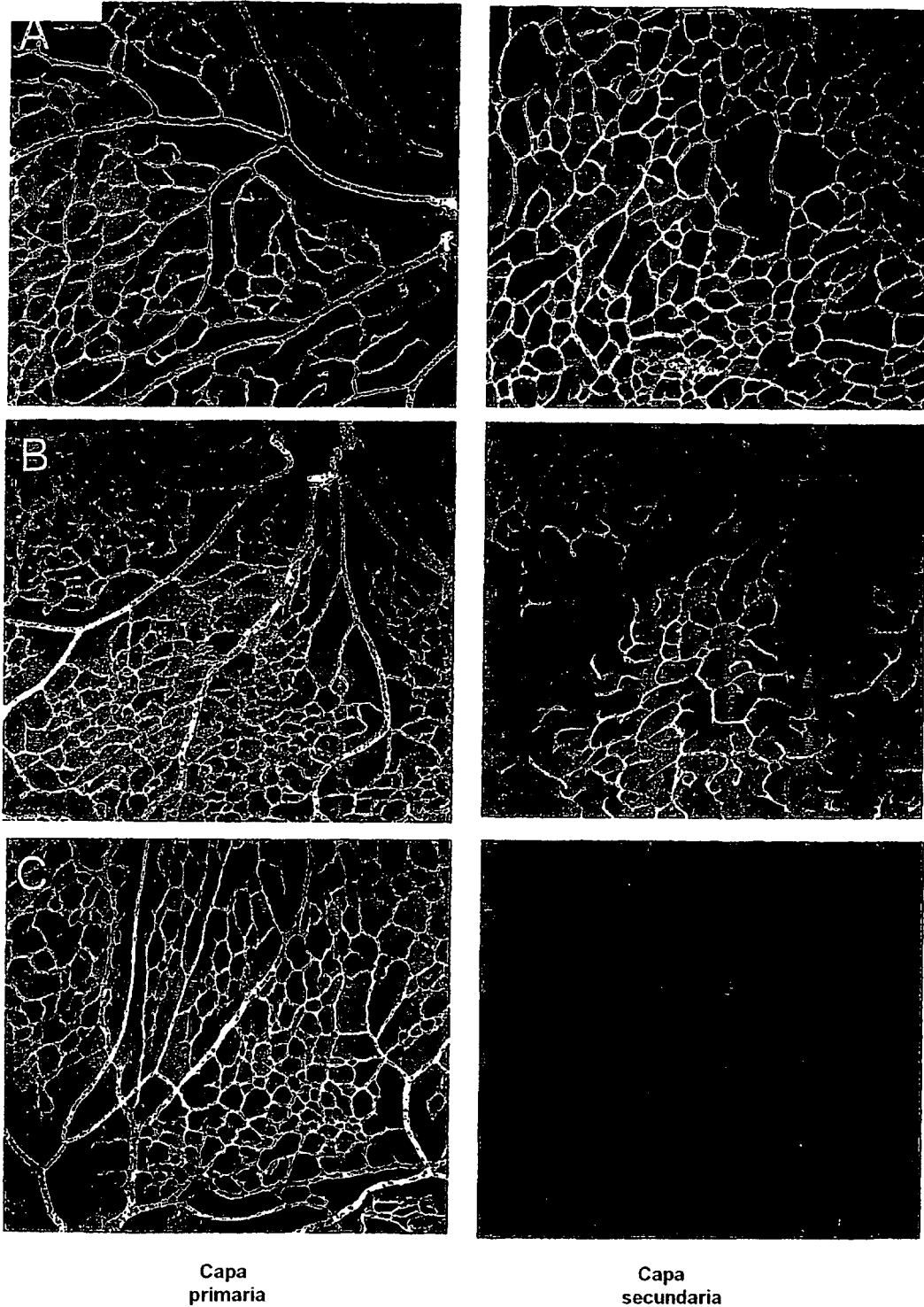


FIGURA 2

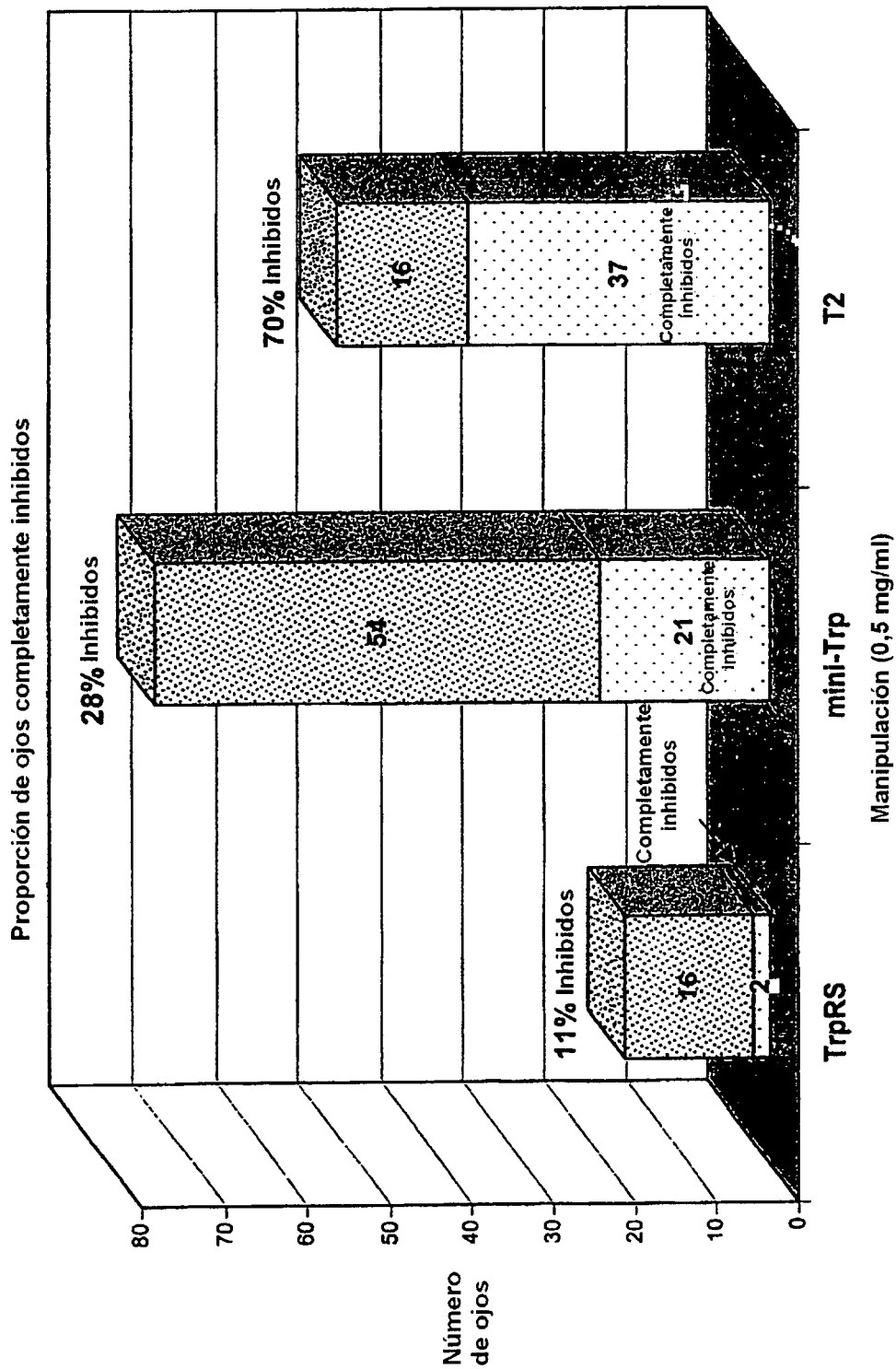


FIGURA 3

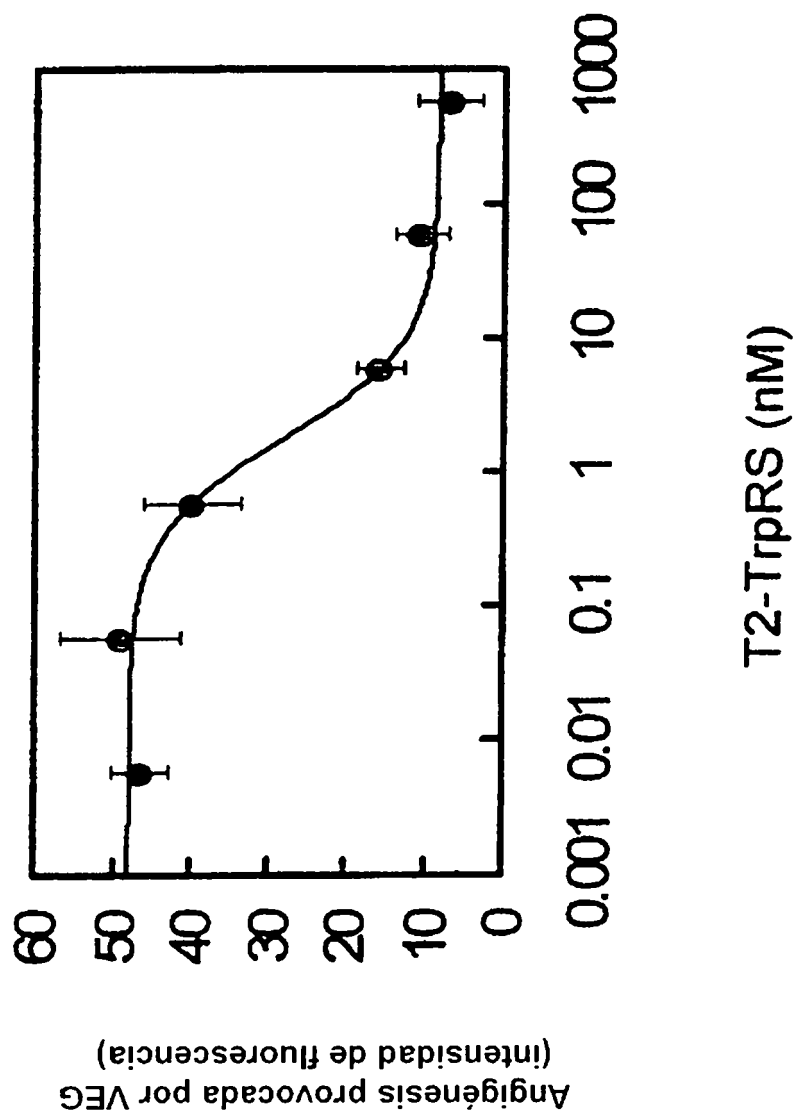


FIGURA 4

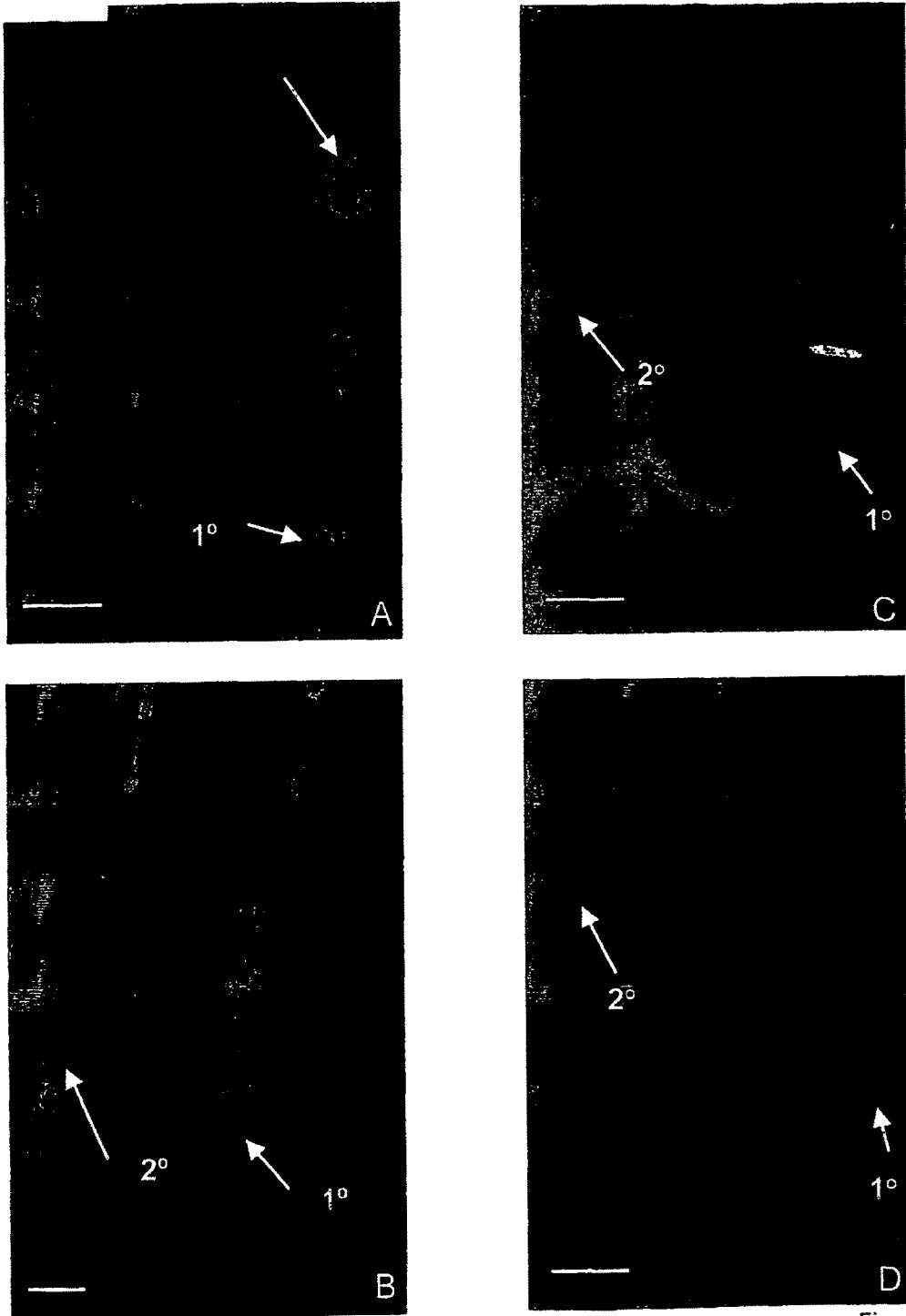


Figura 5

ES 2 318 063 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> The Scripps Research Institute
- 5 <120> Polipéptidos derivados de la triptofanil ARNt sintetasa útiles para la regulación de la angiogénesis
- <130> 18-144
- 10 <150> PCT/US02/05185
<151> 2002-02-22
- <150> 60/270, 951
- 15 <151> 2001-02-23
- <160> 13
- 20 <170> FastSEQ para Windows Version 4.0
- <210> 1
<211> 484
- 25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> TrpRS humana recombinante
- <400> 1
- 35 **Met Pro Asn Ser Glu Pro Ala Ser Leu Leu Glu Leu Phe Asn Ser Ile**
 1 5 10 15
Ala Thr Gln Gly Glu Leu Val Arg Ser Leu Lys Ala Gly Asn Ala Ser
 20 25 30
Lys Asp Glu Ile Asp Ser Ala Val Lys Met Leu Val Ser Leu Lys Met
 35 40 45
40 **Ser Tyr Lys Ala Ala Ala Gly Glu Asp Tyr Lys Ala Asp Cys Pro Pro**
 50 55 60
Gly Asn Pro Ala Pro Thr Ser Asn His Gly Pro Asp Ala Thr Glu Ala
 65 70 75 80
Glu Glu Asp Phe Val Asp Pro Trp Thr Val Gln Thr Ser Ser Ala Lys
 85 90 95
45 **Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly Ser Ser Lys Ile**
 100 105 110
Asp Lys Glu Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg Ala Thr Gly Gln Arg Pro
 115 120 125
50 **His His Phe Leu Arg Arg Gly Ile Phe Phe Ser His Arg Asp Met Asn**
 130 135 140
- Gln Val Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys Pro Phe Tyr Leu Tyr Thr**
 145 150 155 160
55 **Gly Arg Gly Pro Ser Ser Glu Ala Met His Val Gly His Leu Ile Pro**
 165 170 175
Phe Ile Phe Thr Lys Trp Leu Gln Asp Val Phe Asn Val Pro Leu Val
 180 185 190
Ile Gln Met Thr Asp Asp Glu Lys Tyr Leu Trp Lys Asp Leu Thr Leu
 195 200 205
60 **Asp Gln Ala Tyr Gly Asp Ala Val Glu Asn Ala Lys Asp Ile Ile Ala**
 210 215 220
Cys Gly Phe Asp Ile Asn Lys Thr Phe Ile Phe Ser Asp Leu Asp Tyr
 225 230 235 240
65 **Met Gly Met Ser Ser Gly Phe Tyr Lys Asn Val Val Lys Ile Gln Lys**
 245 250 255
His Val Thr Phe Asn Gln Val Lys Gly Ile Phe Gly Phe Thr Asp Ser

ES 2 318 063 T3

5 260 265 270
 Asp Cys Ile Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala Ile Gln Ala Ala Pro Ser
 275 280 285
 Phe Ser Asn Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg Asp Arg Thr Asp Ile Gln
 290 295 300
 Cys Leu Ile Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp Pro Tyr Phe Arg Met Thr
 305 310 315
 Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro Ala Leu Leu His
 325 330 335
 10 Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr Lys Met Ser Ala
 340 345 350
 Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr Asp Thr Ala Lys Gln Ile
 355 360 365
 Lys Thr Lys Val Asn Lys His Ala Phe Ser Gly Gly Arg Asp Thr Ile
 370 375 380
 15 Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val Asp Val Ser Phe
 385 390 395
 Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys Leu Glu Gln Ile
 405 410 415
 20 Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly Glu Leu Lys Lys
 420 425 430
 Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu His Gln Ala Arg
 435 440 445
 Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe Met Thr Pro Arg
 450 455 460
 25 Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln Lys Leu Ala Ala Leu Glu His His
 465 470 475 480
 His His His His

30 <210> 2
 <211> 4877
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> mini TrpRS humana recombinante en pET20B

40 <221> CDS
 <222> (3428)..._(4738)

45 <400> 2

tggcgaatgg gacgcgccct gtageggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcgccgt cctttcgctt tcttcccttc 120
 ctttctcgcc acgttcgceg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
 gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa ctgattagg gtgatggttc 240
 50 acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt 300
 ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cgtctatctc 360
 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
 acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
 tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
 tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600
 55 gattattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttctctg 660
 ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcaag 720
 agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaaagatc cttgagagtt ttcgccccga 780
 agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatccccg 840
 tattgacgcg gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg 900
 60 tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960
 cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020
 aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgcgcttga 1080
 tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140
 65 tgcagcaatg gcaacaactg tgcgcaaact attaacctggc gaactactta ctctagcttc 1200

ES 2 318 063 T3

ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260
 ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320
 cggtatcatt gcagcactgg gccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380
 gagggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 1440
 5 actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 1500
 aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560
 caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620
 aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaac 1680
 accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactctt ttccgaaggt 1740
 10 aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 1800
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tctctgttacc 1860
 agtggctgct gccagtgccg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgtagtt 1920
 accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg 1980
 gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2040
 tcccgaaggg agaaagcggg acaggtatcc ggtaagcggc agggctcggaa caggagagcg 2100
 15 cactagggag cttccagggg gaaagcctg gtatctttat agtctgtcg ggtttcgcca 2160
 cctctgactt cggcgtctat tcttctgcca ctctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 2220
 cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggcttttgc tggccttttg ctcacatggt 2280
 ctttctcgcg ttatccccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2340
 taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcaggtca gtgagcaggg aagcgggaaga 2400
 20 gcgctgctgac cggatatttc tccttacgca tctgtcgggt atttcacacc gcatatatgg 2460
 tgactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520
 cgctacgtga ctgggtcatg gctgcccgcc gacaccgcc aacaccgct gacgcgccct 2580
 gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgct tccgggagct 2640
 gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct 2700
 25 catcagcgtg cgtggaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcacccgcg tccagctcgt 2760
 tgagttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg 2820
 tttttctctg tttggtcact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa 2880
 tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc 2940
 ggttactgga acgttgtgag ggtaacaac tggcggtagt gatgcggcgg gaccagagaa 3000
 30 aaatcactca gggccaatgc cagcgtctcg ttaatacaga ttaggtgtt ccacagggta 3060
 gccagcagca tctctcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgcg 3120
 tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgttgtgtgt caggtcgcag 3180
 acgtttgca gcagcagctg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca tctgctaac 3240
 cagtaaggca acccccgag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcca 3300
 35 cccgtggcca ggaccacaacg ctgcccgaga tctcgatccc gcgaaattaa tacgactcac 3360
 tataaggaga ccacaacggt ttccctctag aaataatttt gtttaacttt aagaaggaga 3420
 tatacat atg agc tac aaa gct gcc gcg ggg gag gat tac aag gct gac 3469
 Met Ser Tyr Lys Ala Ala Ala Gly Glu Asp Tyr Lys Ala Asp
 1 5 10
 tgt cct cca ggg aac cca gca cct acc agt aat cat ggc cca gat gcc 3517
 40 Cys Pro Pro Gly Asn Pro Ala Pro Thr Ser Asn His Gly Pro Asp Ala
 15 20 25 30
 aca gaa gct gaa gag gat ttt gtg gac cca tgg aca gta cag aca agc 3565
 Thr Glu Ala Glu Glu Asp Phe Val Asp Pro Trp Thr Val Gln Thr Ser
 45 35 40 45
 agt gca aaa ggc ata gac tac gat aag etc att gtt cgg ttt gga agt 3613
 Ser Ala Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly Ser
 50 50 55 60
 agt aaa att gac aaa gag cta ata aac cga ata gag aga gcc acc ggc 3661
 Ser Lys Ile Asp Lys Glu Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg Ala Thr Gly
 65 70 75
 caa aga cca cac cac ttc ctg cgc aga ggc atc ttc ttc tca cac aga 3709
 55 Gln Arg Pro His His Phe Leu Arg Arg Gly Ile Phe Phe Ser His Arg
 80 85 90
 gat atg aat cag gtt ctt gat gcc tat gaa aat aag aag cca ttt tat 3757
 Asp Met Asn Gln Val Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys Pro Phe Tyr

ES 2 318 063 T3

	95		100		105		110	
5	ctg tac acg ggc	cgg ggc ccc tct tct	gaa gca atg cat gta ggt cac	3805				
	Leu Tyr Thr Gly Arg Gly Pro Ser Ser	Glu Ala Met His Val Gly His						
		115	120	125				
10	ctc att cca ttt att ttc	aca aag tgg ctc cag gat gta ttt aac gtg	3853					
	Leu Ile Pro Phe Ile Phe Thr Lys Trp	Leu Gln Asp Val Phe Asn Val						
		130	135	140				
15	ccc ttg gtc atc cag atg acg	gat gac gag aag tat ctg tgg aag gac	3901					
	Pro Leu Val Ile Gln Met Thr Asp Asp	Glu Lys Tyr Leu Trp Lys Asp						
		145	150	155				
20	ctg acc ctg gac cag gcc	tat ggc gat gct gtt gag aat gcc aag gac	3949					
	Leu Thr Leu Asp Gln Ala Tyr Gly Asp	Ala Val Glu Asn Ala Lys Asp						
		160	165	170				
25	atc atc gcc tgt ggc ttt	gac atc aac aag act ttc ata ttc tct gac	3997					
	Ile Ile Ala Cys Gly Phe Asp Ile Asn Lys	Thr Phe Ile Phe Ser Asp						
		175	180	185				
30	ctg gac tac atg ggg	atg agc tca ggt ttc tac aaa aat gtg gtg aag	4045					
	Leu Asp Tyr Met Gly Met Ser Ser Gly Phe	Tyr Lys Asn Val Val Lys						
		195	200	205				
35	att caa aag cat gtt acc	ttc aac caa gtg aaa ggc att ttc ggc ttc	4093					
	Ile Gln Lys His Val Thr Phe Asn Gln	Val Lys Gly Ile Phe Gly Phe						
		210	215	220				
40	act gac agc gac tgc	att ggg aag atc agt ttt cct gcc atc cag gct	4141					
	Thr Asp Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile	Ser Phe Pro Ala Ile Gln Ala						
		225	230	235				
45	gct ccc tcc ttc agc aac	tca ttc cca cag atc ttc cga gac agg acg	4189					
	Ala Pro Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro	Gln Ile Phe Arg Asp Arg Thr						
		240	245	250				
50	gat atc cag tgc ctt atc	cca tgt gcc att gac cag gat cct tac ttt	4237					
	Asp Ile Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala	Ile Asp Gln Asp Pro Tyr Phe						
		255	260	265				
55	aga atg aca agg gac gtc	gcc ccc agg atc ggc tat cct aaa cca gcc	4285					
	Arg Met Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg	Ile Gly Tyr Pro Lys Pro Ala						
		275	280	285				
60	ctg ttg cac tcc acc	ttc ttc cca gcc ctg cag ggc gcc cag acc aaa	4333					
	Leu Leu His Ser Thr Phe Phe Pro Ala	Leu Gln Gly Ala Gln Thr Lys						
		290	295	300				
65	atg agt gcc agc gac cca	aac tcc tcc atc ttc ctc acc gac acg gcc	4381					
	Met Ser Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser	Ile Phe Leu Thr Asp Thr Ala						
		305	310	315				
70	aag cag atc aaa acc	aag gtc aat aag cat gcg ttt tct gga ggc aga	4429					
	Lys Gln Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys	His Ala Phe Ser Gly Gly Arg						
		320	325	330				
75	gac acc atc gag gag cac	agg cag ttt ggg ggc aac tgt gat gtg gac	4477					
	Asp Thr Ile Glu Glu His Arg Gln Phe	Gly Gly Asn Cys Asp Val Asp						
		335	340	345				
80	gtg tct ttc atg tac	ctg acc ttc ttc ctc gag gac gac gac aag ctc	4525					

ES 2 318 063 T3

Val Ser Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys Leu
 355 360 365

5 gag cag atc agg aag gat tac acc agc gga gcc atg ctc acc ggt gag 4573
 Glu Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly Glu
 370 375 380

10 ctc aag aag gca ctc ata gag gtt ctg cag ccc ttg atc gca gag cac 4621
 Leu Lys Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu His
 385 390 395

15 cag gcc cgg cgc aag gag gtc acg gat gag ata gtg aaa gag ttc atg 4669
 Gln Ala Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe Met
 400 405 410

act ccc cgg aag ctg tcc ttc gac ttt cag aag ctt gcg gcc gca ctc 4717
 Thr Pro Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln Lys Leu Ala Ala Ala Leu
 415 420 425 430

20 gag cac cac cac cac cac cac tgagatccgg ctgctaaca agcccgaag 4768
 Glu His His His His His His
 435

25 gaagctgagt tggctgctgc caccgctgag caataactag cataaccct tggggcctct 4828
 aaacgggtct tgaggggttt tttgctgaaa ggaggaacta tatccggat 4877

<210> 3

<211> 437

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> mini Trps humano en Pet20b

<400> 3

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

65

ES 2 318 063 T3

Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala Ile Gln Ala Ala Pro
 225 230 235 240
 Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg Asp Arg Thr Asp Ile
 245 250 255
 5 Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp Pro Tyr Phe Arg Met
 260 265 270
 Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro Ala Leu Leu
 275 280 285
 10 His Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr Lys Met Ser
 290 295 300
 Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr Asp Thr Ala Lys Gln
 305 310 315 320
 Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys His Ala Phe Ser Gly Gly Arg Asp Thr
 325 330 335
 15 Ile Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val Asp Val Ser
 340 345 350
 Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys Leu Glu Gln
 355 360 365
 20 Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly Glu Leu Lys
 370 375 380
 Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu His Gln Ala
 385 390 395 400
 Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe Met Thr Pro
 405 410 415
 25 Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His
 420 425 430
 His His His His His
 435

<210> 4
 30 <211> 4811
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Producto de escisión T1 de recombinante TrpRs humano
 40 <221> CDS
 <222> (3428)..._(4672)
 <400> 4

45 tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 60
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcgcctcct cctttcgctt tcttccttc 120
 ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
 gttccgattt agtgctttac ggacacctga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc 240
 50 acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt 300
 cttaaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc 360
 ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
 acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
 tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
 55 tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600
 gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt 660
 ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720
 agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 780
 agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg 840
 60 tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg 900
 tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960
 cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020
 aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga 1080
 tcggtgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140
 65 tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc 1200
 ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260

ES 2 318 063 T3

ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320
 cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380
 gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 1440
 actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 1500
 5 aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560
 caaaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620
 aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaac 1680
 accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt tttccgaagg 1740
 aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 1800
 10 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacttc getctgctaa tcctgttacc 1860
 agtgctgct gccagtgcg ataagtctg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagt 1920
 accggataag gcgcagcgg cggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagttgga 1980
 gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2040
 tcccgaagg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggctcgaa caggagagcg 2100
 caccgagggagt cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtctctgctg ggtttcgcga 2160
 15 cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgat ctctgctagg ggcgagacc tatggaaaaa 2220
 cgccagcaac gcggcctttt tacggttctt ggcccttttg tggccttttg ctacatggt 2280
 ctttctgctg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2340
 taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcagtgca gtgagcaggg aagcgggaaga 2400
 20 ggcactctca gctgtaaac ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520
 cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgcct 2580
 gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgct tccgggagct 2640
 gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct 2700
 cctcagcgtg gtctgtaagc gattcacaga tgtctgctg ttcattccgctg tccagctcgt 2760
 25 tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggt ttctgataaa gcggggccatg ttaagggcgg 2820
 ttttttctg tttggtcact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa 2880
 tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgcc 2940
 gtttactgga acgttctgag ggtaaacaa cggcggatg gatgcggcgg gaccagagaa 3000
 aaatcactca gggtaaatgc cagcgccttc ttaatacaga ttaggtgtt ccacaggta 3060
 gccagcagca tctgctgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgt gacttccgctg 3120
 30 tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgttgtgct caggtcgcag 3180
 acgttttgca gcagcagtcg cttcagcttc gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac 3240
 cagtaaggca accccgcccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca 3300
 cccgtggcca ggacccaacg ctgcccgaga tctcgatccc gcgaaattaa tacgactcac 3360
 tatagggaga ccacaacggt ttcctctag aaataattt gtttaacttt aagaaggaga 3420
 35 tatacat atg agt aat cat ggc cca gat gcc aca gaa gct gaa gag gat 3469
 Met Ser Asn His Gly Pro Asp Ala Thr Glu Ala Glu Glu Asp
 1 5 10
 ttt gtg gac cca tgg aca gta cag aca agc agt gca aaa ggc ata gac 3517
 Phe Val Asp Pro Trp Thr Val Gln Thr Ser Ser Ala Lys Gly Ile Asp 30
 15 20 25 30
 tac gat aag ctc att gtt cgg ttt gga agt agt aaa att gac aaa gag 3565
 Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly Ser Ser Lys Ile Asp Lys Glu 45
 35 40 45
 cta ata aac cga ata gag aga gcc acc ggc caa aga cca cac cac ttc 3613
 Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg Ala Thr Gly Gln Arg Pro His His Phe 60
 50 55
 ctg cgc aga ggc atc ttc ttc tca cac aga gat atg aat cag gtt ctt 3661
 Leu Arg Arg Gly Ile Phe Phe Ser His Arg Asp Met Asn Gln Val Leu 75
 60 65
 gat gcc tat gaa aat aag aag cca ttt tat ctg tac acg ggc cgg gcc 3709
 Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys Pro Phe Tyr Leu Tyr Thr Gly Arg Gly 90
 70 75 80 85 90
 ccc tct tct gaa gca atg cat gta ggt cac ctc att cca ttt att ttc 3757
 Pro Ser Ser Glu Ala Met His Val Gly His Leu Ile Pro Phe Ile Phe 110
 95 100 105 110

ES 2 318 063 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

```

aca aag tgg ctc cag gat gta ttt aac gtg ccc ttg gtc atc cag atg 3805
Thr Lys Trp Leu Gln Asp Val Phe Asn Val Pro Leu Val Ile Gln Met
      115                      120                      125

acg gat gac gag aag tat ctg tgg aag gac ctg acc ctg gac cag gcc 3853
Thr Asp Asp Glu Lys Tyr Leu Trp Lys Asp Leu Thr Leu Asp Gln Ala
      130                      135                      140

tat ggc gat gct gtt gag aat gcc aag gac atc atc gcc tgt ggc ttt 3901
Tyr Gly Asp Ala Val Glu Asn Ala Lys Asp Ile Ile Ala Cys Gly Phe
      145                      150                      155

gac atc aac aag act ttc ata ttc tct gac ctg gac tac atg ggg atg 3949
Asp Ile Asn Lys Thr Phe Ile Phe Ser Asp Leu Asp Tyr Met Gly Met
      160                      165                      170

agc tca ggt ttc tac aaa aat gtg gtg aag att caa aag cat gtt acc 3997
Ser Ser Gly Phe Tyr Lys Asn Val Val Lys Ile Gln Lys His Val Thr
      175                      180                      185

ttc aac caa gtg aaa ggc att ttc ggc ttc act gac agc gac tgc att 4045
Phe Asn Gln Val Lys Gly Ile Phe Gly Phe Thr Asp Ser Asp Cys Ile
      195                      200                      205

ggg aag atc agt ttt cct gcc atc cag gct gct ccc tcc ttc agc aac 4093
Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala Ile Gln Ala Ala Pro Ser Phe Ser Asn
      210                      215                      220

tca ttc cca cag atc ttc cga gac agg acg gat atc cag tgc ctt atc 4141
Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg Asp Arg Thr Asp Ile Gln Cys Leu Ile
      225                      230                      235

cca tgt gcc att gac cag gat cct tac ttt aga atg aca agg gac gtc 4189
Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp Pro Tyr Phe Arg Met Thr Arg Asp Val
      240                      245                      250

gcc ccc agg atc ggc tat cct aaa cca gcc ctg ttg cac tcc acc ttc 4237
Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro Ala Leu Leu His Ser Thr Phe
      255                      260                      265

ttc cca gcc ctg cag ggc gcc cag acc aaa atg agt gcc agc gac cca 4285
Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr Lys Met Ser Ala Ser Asp Pro
      275                      280                      285

aac tcc tcc atc ttc ctc acc gac acg gcc aag cag atc aaa acc aag 4333
Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr Asp Thr Ala Lys Gln Ile Lys Thr Lys
      290                      295                      300

gtc aat aag cat gcg ttt tct gga ggg aga gac acc atc gag gag cac 4381
Val Asn Lys His Ala Phe Ser Gly Gly Arg Asp Thr Ile Glu Glu His
      305                      310                      315

agg cag ttt ggg ggc aac tgt gat gtg gac gtg tct ttc atg tac ctg 4429
Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val Asp Val Ser Phe Met Tyr Leu
      320                      325                      330

acc ttc ttc ctc gag gac gac gac aag ctc gag cag atc agg aag gat 4477
Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys Leu Glu Gln Ile Arg Lys Asp
      335                      340                      345                      350

tac acc agc gga gcc atg ctc acc ggt gag ctc aag aag gca ctc ata 4525
Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly Glu Leu Lys Lys Ala Leu Ile
  
```

ES 2 318 063 T3

```

          355                360                365
gag gtt ctg cag ccc ttg atc gca gag cac cag gcc cgg cgc aag gag 4573
Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu His Gln Ala Arg Arg Lys Glu
          370                375                380

gtc acg gat gag ata gtg aaa gag ttc atg act ccc cgg aag ctg tcc 4621
Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe Met Thr Pro Arg Lys Leu Ser
          385                390                395

ttc gac ttt cag aag ctt gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac 4669
Phe Asp Phe Gln Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His
          400                405                410

cac tgagatccgg ctgctaacaa agccccaaaag gaagctgagt tggctgctgc 4722
His
415

caccgctgag caataactag cataaccct tggggcctct aaacgggtct tgaggggttt 4782
ttgctgaaa ggaggaacta tatccggat 4811

```

5 <210> 5

<211> 415

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Producto de escisión T1 de recombinante TrpRs humano

<400> 5

```

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

```

ES 2 318 063 T3

			260					265					270			
	Ala	Leu	Gln	Gly	Ala	Gln	Thr	Lys	Met	Ser	Ala	Ser	Asp	Pro	Asn	Ser
			275					280					285			
	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Asp	Thr	Ala	Lys	Gln	Ile	Lys	Thr	Lys	Val	Asn
5			290				295					300				
	Lys	His	Ala	Phe	Ser	Gly	Gly	Arg	Asp	Thr	Ile	Glu	Glu	His	Arg	Gln
						310					315				320	
	Phe	Gly	Gly	Asn	Cys	Asp	Val	Asp	Val	Ser	Phe	Met	Tyr	Leu	Thr	Phe
				325						330				335		
	Phe	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Lys	Leu	Glu	Gln	Ile	Arg	Lys	Asp	Tyr	Thr
				340						345				350		
10	Ser	Gly	Ala	Met	Leu	Thr	Gly	Glu	Leu	Lys	Lys	Ala	Leu	Ile	Glu	Val
				355					360				365			
	Leu	Gln	Pro	Leu	Ile	Ala	Glu	His	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Glu	Val	Thr
				370			375						380			
	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Glu	Phe	Met	Thr	Pro	Arg	Lys	Leu	Ser	Phe	Asp
						390					395				400	
15	Phe	Gln	Lys	Leu	Ala	Ala	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His	His	His
				405					410						415	

<210> 6

20 <211> 4742

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Producto de escisión T2 de recombinante TrpRs humano

<221> CDS

30 <222> (3428)...(4603)

<400> 6

```

35  tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcggtgtggt tggttacgcg 60
    cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctc agcgcgcgct cctttcgttt tcttcccttc 120
    ctttctcgcc acgttcgccc gctttcccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180
    gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatgggtc 240
    acgtagtggg ccacgcgccct gatagacggg ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
40  ctttaatagt ggactcctgt tccaaactgg aacaacactc aacctatctc cgtctatttc 360
    ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
    acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
    tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 540
    tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 600
    gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt 660
45  ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 720
    agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 780
    agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccc 840
    tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg 900
    tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 960
    cagtgtctgc ataaccatga gtgataaac tgccggccaac ttacttctga caacgatcgg 1020
50  aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgcgcttga 1080
    tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 1140
    tgacgcaatg gcaacaacgt tgcgcaaac attaacctggc gaactactta ctctagcttc 1200
    ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggg ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc 1260
    ggcccttccg gctggctggg ttattgtgta taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg 1320
    cggtatcatt cgagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 1380
55  gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc 1440
    actgattaag catttgtaac tgtcagacca agtttactca tataacttt agattgattt 1500
    aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 1560
    caaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa 1620
    aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaac 1680
60  accgctacca cggttggttt gtttcggga tcaagagcta ccaactcttt ttcggaaggt 1740
    aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 1800

```

65

ES 2 318 063 T3

ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc 1860
 agtggctgct gccagtgccg ataagtctgt tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt 1920
 accggataag ggcgagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga 1980
 5 ggaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct 2040
 tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 2100
 caccgaggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggttccgcca 2160
 cctctgactt gagcgtcgat tttgtgatg ctctgcaggg gggcggagcc tatggaaaaa 2220
 cgccagcaac ggggcctttt tacggttctt ggccttttgc tggccttttg ctcacatggt 2280
 10 ctttctctcg ttatccccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 2340
 taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcagtgca gtgagcagag aagcgggaaga 2400
 ggcctctgat cggatatttc tccttacgca tctgtgctgt atttcacacc gcatatatgg 2460
 tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat 2520
 15 cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccc 2580
 gacgggcttg tctgctccc gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgct tccgggagct 2640
 gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct 2700
 catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg tcatccgcg tccagctcgt 2760
 tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg 2820
 ttttttctctg tttggctact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa 2880
 20 tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc 2940
 ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaaac tggcgggatg gatgcggcgg gaccagagaa 3000
 aatcactca gggtaaatgc cagcgtctcg ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggta 3060
 gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgcg 3120
 tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgttgttgct caggctcgag 3180
 25 acgttttgca gcagcagtcg cttcacgctt gctcgcgat cggtgattca tttgtctaac 3240
 cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcttcaacga caggagcacg atcatgcgca 3300
 cccgtggcca ggacccaacg ctgcccgaga tctcgatccc gcgaaattaa tacgactcac 3360
 tatagggaga ccacaacggt tccctctag aaataatgtt gtttaacttt aagaaggaga 3420
 tatacat atg agt gca aaa ggc ata gac tac gat aag ctc att gtt cgg 3469
 Met Ser Ala Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg
 1 5 10

 ttt gga agt agt aaa att gac aaa gag cta ata aac cga ata gag aga 3517
 Phe Gly Ser Ser Lys Ile Asp Lys Glu Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg
 15 20 25 30

 gcc acc ggc caa aga cca cac cac ttc ctg cgc aga ggc atc ttc ttc 3565
 Ala Thr Gly Gln Arg Pro His His Phe Leu Arg Arg Gly Ile Phe Phe
 35 40 45

 tca cac aga gat atg aat cag gtt ctt gat gcc tat gaa aat aag aag 3613
 Ser His Arg Asp Met Asn Gln Val Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys
 50 55 60

 cca ttt tat ctg tac acg ggc cgg ggc ccc tct tct gaa gca atg cat 3661
 Pro Phe Tyr Leu Tyr Thr Gly Arg Gly Pro Ser Ser Glu Ala Met His
 65 70 75

 gta ggt cac ctc att cca ttt att ttc aca aag tgg ctc cag gat gta 3709
 Val Gly His Leu Ile Pro Phe Ile Phe Thr Lys Trp Leu Gln Asp Val
 80 85 90

 ttt aac gtg ccc ttg gtc atc cag atg acg gat gac gag aag tat ctg 3757
 Phe Asn Val Pro Leu Val Ile Gln Met Thr Asp Asp Glu Lys Tyr Leu
 95 100 105 110

 tgg aag gac ctg acc ctg gac cag gcc tat ggc gat gct gtt gag aat 3805
 Trp Lys Asp Leu Thr Leu Asp Gln Ala Tyr Gly Asp Ala Val Glu Asn
 115 120 125

 gcc aag gac atc atc gcc tgt ggc ttt gac atc aac aag act ttc ata 3853
 Ala Lys Asp Ile Ile Ala Cys Gly Phe Asp Ile Asn Lys Thr Phe Ile
 130 135 140

ES 2 318 063 T3

ttc tct gac ctg gac tac atg ggg atg agc tca ggt ttc tac aaa aat 3901
 Phe Ser Asp Leu Asp Tyr Met Gly Met Ser Ser Gly Phe Tyr Lys Asn
 145 150 155

5
 gtg gtg aag att caa aag cat gtt acc ttc aac caa gtg aaa ggc att 3949
 Val Val Lys Ile Gln Lys His Val Thr Phe Asn Gln Val Lys Gly Ile
 160 165 170

10
 ttc ggc ttc act gac agc gac tgc att ggg aag atc agt ttt cct gcc 3997
 Phe Gly Phe Thr Asp Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala
 175 180 185 190

15
 atc cag gct gct ccc tcc ttc agc aac tca ttc cca cag atc ttc cga 4045
 Ile Gln Ala Ala Pro Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg
 195 200 205

20
 gac agg acg gat atc cag tgc ctt atc cca tgt gcc att gac cag gat 4093
 Asp Arg Thr Asp Ile Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp
 210 215 220

25
 cct tac ttt aga atg aca agg gac gtc gcc ccc agg atc ggc tat cct 4141
 Pro Tyr Phe Arg Met Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro
 225 230 235

30
 aaa cca gcc ctg ttg cac tcc acc ttc ttc cca gcc ctg cag ggc gcc 4189
 Lys Pro Ala Leu Leu His Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala
 240 245 250

35
 cag acc aaa atg agt gcc agc gac cca aac tcc tcc atc ttc ctc acc 4237
 Gln Thr Lys Met Ser Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr
 255 260 265 270

40
 gac acg gcc aag cag atc aaa acc aag gtc aat aag cat gcg ttt tct 4285
 Asp Thr Ala Lys Gln Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys His Ala Phe Ser
 275 280 285

45
 gga ggg aga gac acc atc gag gag cac agg cag ttt ggg ggc aac tgt 4333
 Gly Gly Arg Asp Thr Ile Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys
 290 295 300

50
 gat gtg gac gtg tct ttc atg tac ctg acc ttc ttc ctc gag gac gac 4381
 Asp Val Asp Val Ser Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp
 305 310 315

55
 gac aag ctc gag cag atc agg aag gat tac acc agc gga gcc atg ctc 4429
 Asp Lys Leu Glu Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu
 320 325 330

60
 acc ggt gag ctc aag aag gca ctc ata gag gtt ctg cag ccc ttg atc 4477
 Thr Gly Glu Leu Lys Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile
 335 340 345 350

65
 gca gag cac cag gcc cgg cgc aag gag gtc acg gat gag ata gtg aaa 4525
 Ala Glu His Gln Ala Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys
 355 360 365

70
 gag ttc atg act ccc cgg aag ctg tcc ttc gac ttt cag aag ctt gcg 4573
 Glu Phe Met Thr Pro Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln Lys Leu Ala
 370 375 380

75
 gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac tgagatccgg ctgctaacia 4623
 Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 385 390

80
 agccccgaaag gaagctgagt tggctgctgc caccgctgag caataactag cataaccct 4683
 tggggcctct aaacgggtct tgaggggttt tttgctgaaa ggaggaacta tatccggat 4742

ES 2 318 063 T3

<210> 7

<211> 392

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Producto de escisión T2 de recombinante TrpRs humano

10

<400> 7

15 Met Ser Ala Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Lys Ile Asp Lys Glu Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg Ala Thr
 20 25 30
 Gly Gln Arg Pro His His Phe Leu Arg Arg Gly Ile Phe Ser His
 35 40 45
 Arg Asp Met Asn Gln Val Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys Pro Phe
 50 55 60
 Tyr Leu Tyr Thr Gly Arg Gly Pro Ser Ser Glu Ala Met His Val Gly
 65 70 75 80
 His Leu Ile Pro Phe Ile Phe Thr Lys Trp Leu Gln Asp Val Phe Asn
 85 90 95
 25 Val Pro Leu Val Ile Gln Met Thr Asp Glu Lys Tyr Leu Trp Lys
 100 105 110
 Asp Leu Thr Leu Asp Gln Ala Tyr Gly Asp Ala Val Glu Asn Ala Lys
 115 120 125
 Asp Ile Ile Ala Cys Gly Phe Asp Ile Asn Lys Thr Phe Ile Phe Ser
 130 135 140
 30 Asp Leu Asp Tyr Met Gly Met Ser Ser Gly Phe Tyr Lys Asn Val Val
 145 150 155 160
 Lys Ile Gln Lys His Val Thr Phe Asn Gln Val Lys Gly Ile Phe Gly
 165 170 175
 35 Phe Thr Asp Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala Ile Gln
 180 185 190
 Ala Ala Pro Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg Asp Arg
 195 200 205
 Thr Asp Ile Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp Pro Tyr
 210 215 220
 40 Phe Arg Met Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro
 225 230 235 240
 Ala Leu Leu His Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr
 245 250 255
 Lys Met Ser Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr Asp Thr
 260 265 270
 45 Ala Lys Gln Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys His Ala Phe Ser Gly Gly
 275 280 285
 Arg Asp Thr Ile Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val
 290 295 300
 Asp Val Ser Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys
 305 310 315 320
 50 Leu Glu Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly
 325 330 335
 Glu Leu Lys Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu
 340 345 350
 55 His Gln Ala Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe
 355 360 365
 Met Thr Pro Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln Lys Leu Ala Ala Ala
 370 375 380
 Leu Glu His His His His His His
 385 390

60

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 318 063 T3

<400> 8

Ser Asn His Gly Pro
1 5

5

<210> 9

<211> 5

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

15

Ser Ala Lys Gly Ile
1 5

20 <210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 10

His Val Gly His
1

30

<210> 11

<211> 5

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

40

Lys Met Ser Ala Ser
1 5

45

<210> 12

<211> 378

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 318 063 T3

<400> 12

Ser Ala Lys Gly Ile Asp Tyr Asp Lys Leu Ile Val Arg Phe Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Lys Ile Asp Lys Glu Leu Ile Asn Arg Ile Glu Arg Ala Thr Gly
 20 25 30
 Gln Arg Pro His His Phe Leu Arg Arg Gly Ile Phe Phe Ser His Arg
 35 40 45
 Asp Met Asn Gln Val Leu Asp Ala Tyr Glu Asn Lys Lys Pro Phe Tyr
 50 55 60
 Leu Tyr Thr Gly Arg Gly Pro Ser Ser Glu Ala Met His Val Gly His
 65 70 75 80
 Leu Ile Pro Phe Ile Phe Thr Lys Trp Leu Gln Asp Val Phe Asn Val
 85 90 95
 Pro Leu Val Ile Gln Met Thr Asp Asp Glu Lys Tyr Leu Trp Lys Asp
 100 105 110
 Leu Thr Leu Asp Gln Ala Tyr Gly Asp Ala Val Glu Asn Ala Lys Asp
 115 120 125
 Ile Ile Ala Cys Gly Phe Asp Ile Asn Lys Thr Phe Ile Phe Ser Asp
 130 135 140
 Leu Asp Tyr Met Gly Met Ser Ser Gly Phe Tyr Lys Asn Val Val Lys
 145 150 155 160
 Ile Gln Lys His Val Thr Phe Asn Gln Val Lys Gly Ile Phe Gly Phe
 165 170 175
 Thr Asp Ser Asp Cys Ile Gly Lys Ile Ser Phe Pro Ala Ile Gln Ala
 180 185 190
 Ala Pro Ser Phe Ser Asn Ser Phe Pro Gln Ile Phe Arg Asp Arg Thr
 195 200 205
 Asp Ile Gln Cys Leu Ile Pro Cys Ala Ile Asp Gln Asp Pro Tyr Phe
 210 215 220
 Arg Met Thr Arg Asp Val Ala Pro Arg Ile Gly Tyr Pro Lys Pro Ala
 225 230 235 240
 Leu Leu His Ser Thr Phe Phe Pro Ala Leu Gln Gly Ala Gln Thr Lys
 245 250 255
 Met Ser Ala Ser Asp Pro Asn Ser Ser Ile Phe Leu Thr Asp Thr Ala
 260 265 270
 Lys Gln Ile Lys Thr Lys Val Asn Lys His Ala Phe Ser Gly Gly Arg
 275 280 285
 Asp Thr Ile Glu Glu His Arg Gln Phe Gly Gly Asn Cys Asp Val Asp
 290 295 300
 Val Ser Phe Met Tyr Leu Thr Phe Phe Leu Glu Asp Asp Asp Lys Leu
 305 310 315 320
 Glu Gln Ile Arg Lys Asp Tyr Thr Ser Gly Ala Met Leu Thr Gly Glu
 325 330 335
 Leu Lys Lys Ala Leu Ile Glu Val Leu Gln Pro Leu Ile Ala Glu His
 340 345 350
 Gln Ala Arg Arg Lys Glu Val Thr Asp Glu Ile Val Lys Glu Phe Met
 355 360 365
 Thr Pro Arg Lys Leu Ser Phe Asp Phe Gln
 370 375

<210> 13

<211> 401

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

65

ES 2 318 063 T3

<400> 13

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

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

65