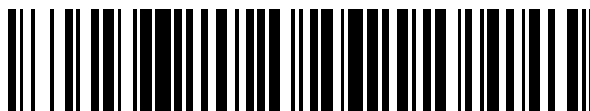


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 136**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2013** **PCT/US2013/026494**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013** **WO13123432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2013** **E 13749967 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017** **EP 2814514**

54 Título: **Histidil-tRNA sintetasas para tratar enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias**

30 Prioridad:

16.02.2012 US 201261599802 P

04.06.2012 US 201261655358 P

12.11.2012 US 201261725414 P

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

31.01.2018

73 Titular/es:

ATYR PHARMA, INC. (50.0%)
3545 John Hopkins Court, Suite No. 250
San Diego, CA 92121, US y
PANGU BIOPHARMA LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

CHIANG, KYLE P.;
GARDINER, ELISABETH;
LAU, CHING FUN;
LO, WING-SZE;
GREVE, JEFFREY;
ASHLOCK, MELISSA y
MENDLEIN, JOHN D.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 652 136 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Histidil-tRNA sintetasas para tratar enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias

5 ANTECEDENTES

Campo técnico

Las realizaciones de la presente descripción se refieren en general a polipéptidos de histidil-tRNA sintetasa que tienen características mejoradas, composiciones que comprenden los polipéptidos de HRS y procedimientos relacionados de uso de los polipéptidos de HRS o composiciones para tratar diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, que incluyen procedimientos de tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias relacionadas con anticuerpos anti-Jo-1.

15 Descripción de la técnica relacionada

Las fisiocrinas son proteínas de origen natural en general pequeñas presentes en la familia de genes de las aminoacil-tRNA sintetasas (AARS) de los organismos superiores, que no son necesarias para el bien establecido papel de las aminoacil-tRNA sintetasas en la síntesis de proteínas. Hasta que se descubrió el paradigma de las fisiocrinas, las aminoacil-tRNA sintetasas, una familia de aproximadamente 20 enzimas, eran conocidas sólo por su expresión ubicua en todas las células vivas, y su papel esencial en el proceso de la síntesis de proteínas. Sin embargo, hallazgos científicos más recientes sugieren ahora que las aminoacil-tRNA sintetasas poseen papeles adicionales más allá de la síntesis de proteínas y de hecho han evolucionado en organismos multicelulares para desempeñar papeles homeostáticos importantes en la fisiología y la enfermedad de los tejidos.

Las evidencias de la existencia de la función no canónica de las AARS incluyen comparaciones de secuencias bien definidas que establecen que durante la evolución desde organismos unicelulares simples a formas de vida más complejas, las AARS han evolucionado para ser estructuralmente más complejas a través de la adición de dominios anexos, sin perder la capacidad de facilitar la síntesis de proteínas.

En coherencia con esta hipótesis, en los eucariotas superiores se ha encontrado un conjunto rico y diverso de funciones expandidas para las AARS, y en particular para las tRNA sintetasas humanas. Estos datos, que se basan en el análisis directo de dominios individuales, así como en el descubrimiento de mutaciones en genes para tRNA sintetasas que se han relacionado causalmente con la enfermedad, pero no afectan a la aminoacilación o actividad de síntesis de las proteínas, sugieren que estos dominios recién anexados, o fisiocrinas, son fundamentales para las funciones no canónicas recién adquiridas de las AARS.

Además, actualmente existe el reconocimiento creciente de que tRNA sintetasas específicas tales como la histidil-tRNA sintetasa (HARS, HRS o HisRS) pueden ser liberadas o secretadas desde células vivas y pueden proporcionar señales de acción localmente importantes con, entre otras, propiedades inmunomoduladoras, quimiotácticas y angiogénas. La confirmación directa del papel de las AARS como moléculas de señalización extracelular se ha obtenido a través de estudios que muestran la secreción y liberación extracelular de tRNA sintetasas específicas, así como la demostración directa de que la adición de fragmentos de las tRNA sintetasas que comprenden los dominios recién anexados (fisiocrinas), pero no otros fragmentos que carecen de estos dominios, están activos en una serie de vías de señalización extracelular. Estas fisiocrinas, que incluyen las derivadas de HRS, representan una oportunidad nueva y antes no conocida de desarrollar nuevas proteínas terapéuticas de primera clase para tratar la enfermedad humana.

Estudios recientes han establecido también que algunas tRNA sintetasas incluyen nuevos elementos genéticos reguladores, que incluyen elementos ALU (Rudinger-Thirion y col., *PNAS USA*. 108(40):E794-E802, 2011) que proporcionan una expresión aumentada específica del tipo celular, o splicing alternativo de tRNA sintetasas específicas en tejidos específicos, o en el contexto de enfermedades específicas. Por otra parte algunas fisiocrinas son producidas proteolíticamente en respuesta a estímulos particulares de una forma específica del tipo celular. De forma coherente con la sobreexpresión específica del tipo celular y la liberación extracelular de fisiocrinas, varias enfermedades autoinmunitarias, (en general referidas como síndromes anti-sintetasa) se asocian con la producción de anticuerpos para un grupo definido de tRNA sintetasas (Tzioufas Orphanet (2001) 1-5; Park y col., *Rheumatol. Int.* 31:529-532, 2011).

Los trastornos autoinmunitarios aparecen cuando el sistema inmunitario reacciona contra sus propios tejidos. Las enfermedades autoinmunitarias se clasifican a menudo basándose en si está afectado un solo órgano o tejido o son varios los órganos o tejidos afectados. Las enfermedades autoinmunitarias generalizadas o sistémicas, tales como el

lupus eritematoso sistémico (LES), caracterizado por la afectación de múltiples órganos y tejidos, están asociadas a menudo con la presencia de autoanticuerpos a los componentes celulares fundamentales. Otras enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por autoanticuerpos a antígenos asociados con un único órgano o tejido.

- 5 Las enfermedades autoinmunitarias sistémicas se caracterizan normalmente por la presencia de autoanticuerpos. Algunos de los autoanticuerpos asociados con la enfermedad en concreto pueden ser específicos de la enfermedad y otros pueden ser comunes a muchas enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, el LES, que es un trastorno inmunitario prototípico, se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos que son detectables en otra enfermedad autoinmunitaria, tales como anticuerpos anti-ADN monocatenario, anticuerpos antihistonas y anticuerpos anti-partículas ribonucleares (RNP), y también por la presencia de autoanticuerpos que son específicos del LES, tales como los anticuerpos anti-ADN bicatenario. Otros trastornos autoinmunitarios sistémicos, tales como artritis reumatoide y miopatías inflamatorias (idiopáticas), se caracterizan también por la presencia de autoanticuerpos en los sueros de los pacientes que reaccionan con componentes intracelulares nucleares y citoplásmicos fundamentales. Al igual que con el LES, algunos de estos autoanticuerpos están asociados con otros trastornos autoinmunitarios y algunos están asociados específicamente con miositis autoinmunitaria.

- Las miopatías inflamatorias (idiopáticas) polimiositis, dermatomiositis y los trastornos relacionados, tales como solapamiento de polimiositis-esclerodermia, son miopatías inflamatorias que se caracterizan por inflamación muscular crónica y debilidad muscular proximal. La inflamación muscular provoca hipersensibilidad muscular, debilidad muscular y finalmente degeneración muscular y fibrosis tal como se describe en Plotz y col., *Annals of Internal Med.* 111:143-157, 1989; y Wallace y col., *J. Musculoskelat Med.* 27 (12) 470-479, 2010. También se asocian con la inflamación muscular concentraciones séricas elevadas de aldolasa, creatina cinasa, transaminasas (tales como alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa) y deshidrogenasa láctica. Otros sistemas además de los músculos pueden verse afectados por estas afecciones, para producir artritis, fenómeno de Raynaud y enfermedad pulmonar intersticial. Clínicamente, la polimiositis y la dermatomiositis se distinguen por la presencia de una erupción característica en pacientes con dermatomiositis. Las diferencias en la miositis de estas afecciones pueden distinguirse en algunos estudios de patología muscular.

- La enfermedad pulmonar intersticial (EPI) comprende un grupo heterogéneo de trastornos en los que la fibrosis y la inflamación tienen lugar en las paredes alveolares o en el tejido laxo que rodea a las envolturas peribroncovasculares, los tabiques interlobulillares y la pleura visceral. Se conocen diferentes formas de EPI que comprenden, o están asociadas con, diversas enfermedades autoinmunitarias además de miositis, que incluyen por ejemplo, neumonitis por hipersensibilidad, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y síndrome de Good-pasture.

- La enfermedad muscular inflamatoria (EMI) y la enfermedad pulmonar intersticial (EPI) son enfermedades autoinmunitarias crónicas graves potencialmente mortales, para las cuales las normas de atención actuales incluyen fármacos antiinflamatorios inespecíficos tales como corticoesteroides con posibles efectos secundarios importantes. La causa del inicio de estas enfermedades todavía no se ha establecido, aunque pueden detectarse autoanticuerpos en aproximadamente el 90% de los pacientes con polimiositis y dermatomiositis de acuerdo con Reichlin y Arnett, *Arthritis and Rheum.* 27:1150-1156, 1984. Los sueros de aproximadamente el 60% de estos pacientes forman precipitados con extractos de timo bovino o bazo humano en inmunodifusión (ID) de Ouchterlony, mientras que los sueros de aproximadamente el 80% de estos pacientes tiñen los sustratos del cultivo celular, tales como células HEP-2, por inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Targoff y Reichlin, *Arthritis and Rheum.* 28:796-803, 1985; Nishikai y Reichlin, *Arthritis and Rheum.* 23:881-888, 1980; y Reichlin y col., *J. Clin. Immunol.* 4:40-44, 1984). Existen numerosas especificidades de los autoanticuerpos precipitantes en los pacientes de miositis, pero cada especificidad de anticuerpo individual aparece sólo en una fracción de los pacientes.

- Se han definido muchos autoanticuerpos asociados con miositis o síndrome de solapamiento de miositis y en algunos casos se han identificado los anticuerpos (véase la patente de EE.UU. nº 6.610.823, Antigen associated with polymyositis and with dermatomyositis). Incluyen anticuerpos que están presentes en otros trastornos y también anticuerpos específicos de enfermedades tal como se describe en Targoff y Reichlin, *Mt. Sinai J. of Med.* 55:487-493, 1988.

- Por ejemplo, se ha identificado un grupo de autoanticuerpos asociados con miositis que se dirigen a proteínas citoplásmicas que están relacionadas con tRNA y la síntesis de proteínas, en particular aminoacil-tRNA sintetasas. Entre ellos se incluyen anti-Jo-1, que se dirige contra la histidil-tRNA sintetasa y es el autoanticuerpo más común asociado con trastornos autoinmunitarios de miositis (aproximadamente del 20 al 40% de dichos pacientes de acuerdo con Nishikai y Reichlin, *Arthritis Rheum.* 23:881-888, 1980); anti-PL-7, que se dirige contra treonil-tRNA sintetasa; anti-PL-12, que se dirige contra alanil-tRNA sintetasa, anti-OJ, que se dirige contra isoleucil-tRNA sintetasa, anti-EJ, que se dirige contra glicil-tRNA sintetasa, anti-KS que se dirige contra asparaginil-tRNA sintetasa

(véase en general, Targoff, *Curr. Opin. Rheumatol.* 12 475-481, 2000) y contra fenilalanina-tRNA sintetasa (Betteridge y col., *Rheumat.* 46 1005-1008, 2007). A menudo con las anti-sintetasas se asocia un grupo característico de propiedades (Love y col., *Medicine.* 70:360-374, 1991).

- 5 Anti-U1 RNP, que se encuentra frecuentemente en pacientes con LES, puede también encontrarse en enfermedad del tejido conjuntivo mixta, síndromes de solapamiento que implican miositis, o en algunos casos de miositis en solitario. Este anticuerpo reacciona con proteínas que están presentes únicamente en la ribonucleoproteína nuclear pequeña U1, una de las RNP nucleares que intervienen en el splicing de ARNm. Los autoanticuerpos que están asociados con otras dolencias se encuentran a veces en pacientes con síndrome de solapamiento tal como anti-Sm, anti-Ro/SSA y anti-La/SSB. Anti-Ku se ha encontrado en el síndrome de solapamiento de miositis-esclerodermia y en LES. El antígeno Ku es un complejo de proteínas de unión a ADN con dos componentes de polipéptidos, los dos de los cuales han sido clonados. Anti-Jo-1 y otras anti-sintetasas son específicas de la enfermedad. Otros anticuerpos asociados con miositis son anti-PM-Scl, que está presente en aproximadamente el 5-10% de los pacientes con miositis, muchos de los cuales tienen solapamiento de polimiositis-esclerodermia, y anti-Mi-2, que está presente en aproximadamente el 8% de los pacientes con miositis, casi exclusivamente en dermatomiositis. Anti-Mi-2 se encuentra en titulación alta en aproximadamente el 20% de todos los pacientes con dermatomiositis y en baja titulación, mediante ELISA sólo, en menos del 5% de los pacientes con polimiositis (Targoff y Reichlin, *Mt. Sinai J. of Med.* 55:487-493, 1988).
- 20 Normalmente los pacientes con enfermedad muscular inflamatoria (EMI) y enfermedad pulmonar intersticial (EPI) se presentan cuando son relativamente jóvenes y con buena salud, por desgracia en un subconjunto de pacientes la progresión de la enfermedad puede provocar una discapacidad significativa y alta morbilidad. Por otra parte actualmente no existen fármacos aprobados específicamente para el tratamiento de la población general de EMI y EPI. Las normas de cuidados actuales consisten en administrar fármacos inmunomoduladores y antiinflamatorios inespecíficos tales como metotrexato o azatioprina, y si los síntomas no remiten, ciclosporina (Wallace y col., *J. Musculoskelat Med.* 27:470-479, 2010). Estos fármacos comportan un riesgo importante de efectos secundarios que pueden ser graves con administración crónica. En enfermedad progresiva grave, los afectados pueden ser tratados con inmunoglobulina intravenosa (IGIV). La carga y el coste de los cuidados del tratamiento de pacientes con IGIV son elevados (hasta 10.000 dólares por paciente por el tratamiento mensual), y en una fracción importante de pacientes el tratamiento falla y los pacientes fallecen.

Los documentos US-2010/297.149 y WO-2011/072.265 se refieren a aspectos terapéuticos de la histidil-tRNA sintetasa, por ejemplo enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

- 35 Por consiguiente existe una necesidad importante no satisfecha de procedimientos mejorados para el tratamiento de la enfermedad muscular inflamatoria y las afecciones relacionadas que sean rentables en términos terapéuticos y económicos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 40 **Figura 1** muestra las propiedades antiinflamatorias potenciales de polipéptidos derivados de HRS de ejemplo en un modelo de colitis inducido por TNBS. Los estudios se realizaron en ratones BDF-1 macho, con 12 ratones/grupo; se añadió TNBS y Budesonida a 5 mg/kg al agua. Se administró Resokine (HisRS^{N4}; HRS(1-60)) diariamente por inyección i.v., empezando 3 días antes de tratamiento con TNBS, a una concentración de 1 ó 5 mg/kg.

- 45 **Figura 2** muestra un análisis de SDS-PAGE de HRS de longitud completa y HRS(1-506) en condiciones reducidas y no reducidas. Los geles muestran que HRS de longitud completa es una mezcla ~50:50 de dímero no covalente y unido a SS en condiciones normales y reducidas, y que HRS (1-506) muestra una formación significativamente reducida del dímero ligado a SS, homogeneidad aumentada y monodispersidad con respecto a la proteína de longitud completa.

- 50 **Figura 3** muestra la competencia del anticuerpo anti-Jo-1 que contiene suero con HRS de longitud completa por medio de un ensayo ELISA en el que el HisRS de tipo no mutado de longitud completa está unido a la superficie de una placa de 96 pocillos. La figura muestra datos de tres diluciones de sueros obtenidos de una muestra de suero humano.

- 55 **Figura 4** muestra la competencia del anticuerpo anti-Jo-1 que contiene suero con Resokine (HisRS^{N4}; HRS(1-60)), en comparación con HisRS humano de longitud completa (FL-hu HisRS) por medio de un ensayo ELISA en el que HisRS de tipo no mutado de longitud completa está unida a la superficie de una placa de 96 pocillos. Los datos muestran que Resokine no compite significativamente con unión de anticuerpos a HisRS de longitud completa hasta presentarse a concentraciones mayores que aproximadamente 1×10^{-7} M, cuando la histidil-tRNA sintetasa de

longitud completa está unida a la superficie de la placa.

Figura 5 muestra la competencia del anticuerpo anti-Jo-1 que contiene suero con HisRS^{N8} (HRS(1-506)), en comparación con HisRS humano de longitud completa por medio de un ensayo ELISA en el que HisRS de tipo no mutado humano de longitud completa está unida a la superficie de una placa de 96 pocillos. Los datos muestran que HisRS^{N8} y HisRS de longitud completa comparten curvas de unión de competencia virtualmente idénticas a los anticuerpos anti-Jo-1.

Figura 6 muestra un ensayo ELISA de titulación estándar de anticuerpos anti-Jo-1 que usa esencialmente HARS, o HisRS^{N4} (HRS(1-60)) de longitud completa unido a la superficie de la placa. Los datos muestran que cuando el ensayo se ejecuta en estas condiciones las titulaciones aparentes para anticuerpos a HisRS^{N4} en anticuerpo anti-Jo-1 que contiene suero son comparables a HisRS de longitud completa.

Figura 7 muestra una representación esquemática de la variante de splicing de HRS y otras construcciones de HRS usadas en los estudios de cartografía de epítomos.

Figura 8 muestra los resultados de los estudios de cartografía de epítomos y visualiza la selectividad de anticuerpos de un intervalo de muestras de anticuerpos positivos a Jo-1 con respecto a la unión al dominio WHEP (HisRS^{N4}; SV9; o HRS(1-60)), o una construcción de HisRS suprimido (que comprende los aminoácidos 54-506 de la SEQ ID NO: 1) (dWHEP) que carece del dominio WHEP.

Figura 9 muestra los resultados de estudios de inmunodepleción que usan HRS de longitud completa y HRS(1-506). Los resultados muestran que HARS de longitud completa y HRS(1-506) fueron efectivos en la inmunodepleción de anticuerpos Jo-1 de muestras de suero humano, y que HRS(1-506) fue capaz de eliminar hasta el 99% de los anticuerpos Jo-1 detectables.

Figura 10A muestra la representación esquemática de la estrategia de dosificación usada para evaluar los efectos de HRS(1-506) (o ATYR1940) en un modelo de rata de miositis inducida por estatinas. **Figura 10B** muestra los efectos de HRS(1-506) en la reducción de los niveles de troponina en los músculos en el modelo de rata de miositis inducida por estatinas.

Figuras 11A-11B muestran los efectos de HRS(1-506) en los niveles de CK en el modelo de rata de miositis inducida por estatinas.

Figura 12 muestra que los niveles de HRS endógenas en suero fueron elevados en ratas tratadas con estatina con respecto a ratas no tratadas. Este resultado sugiere que la liberación de las HRS endógenas puede desempeñar un papel en la regulación de la inflamación muscular.

Figura 13 muestra la tinción hematoxilina-eosina de los isquiotibiales en el modelo de rata de miositis inducida por estatinas. Estos resultados muestran una reducción de la degeneración/necrosis muscular y las puntuaciones de inflamación en ratas con inducción de estatinas que fueron tratadas con 1 mg/kg y 3 mg/kg de HRS(1-506) con respecto a ratas tratadas con vehículo y 0,3 mg/kg de ratas tratadas con HRS(1-506).

Figura 14 muestra los resultados del perfil de ARN realizado en los músculos isquiotibiales de ratas con inducción de estatinas, que fueron tratadas con cantidades crecientes de HRS(1-506). Estos resultados mostraron que los 13 genes que tenían elevación en más de 5 veces la respuesta al tratamiento con estatinas se redujeron por el tratamiento con HRS(1-506).

Figura 15A muestra los resultados del perfil de ARN realizado en los músculos isquiotibiales de ratas con inducción de estatinas, y **Figura 15B** muestra los resultados para ratas con inducción de estatinas tratadas con HRS(1-506).

Figura 16 muestra el perfil de transcripción de isquiotibiales de ratas con inducción de estatinas. Estos resultados revelaron que la expresión de 10 genes relacionados con diabetes/síndrome metabólico y varios genes de mantenimiento (datos no mostrados) no se vio influida significativamente por el tratamiento con HRS(1-506).

Figura 17 muestra el perfil de transcripción de isquiotibiales de ratas con inducción de estatinas. Estos resultados revelaron que la expresión de numerosos genes marcadores de células inmunitarias se redujo por el tratamiento con HRS(1-506).

Figuras 18A-18D muestran que el tratamiento con HRS(1-506) redujo la expresión de los genes marcadores de células inmunitarias ITGAL(CD11a) (**Figura 18A**), CD11b (**Figura 18B**), CD8a (**Figura 18C**), CD8b (**Figura 18D**).

Figuras 19A-19C muestran que el tratamiento con HRS(1-506) redujo la expresión de los genes marcadores de células inmunitarias CD18 (**Figura 19A**), CCR5 (**Figura 19B**) y PTPPC (CD45R) (**Figura 19C**).

- 5 **Figura 20** muestra el perfil de transcripción de isquiotibiales de ratas con inducción de estatinas. Estos resultados revelaron que la expresión de numerosos genes marcadores inflamatorios se redujo con el tratamiento con HRS (1-506).

- Figuras 21A-21D** muestran que el tratamiento con HRS(1-506) redujo la expresión de los genes marcadores inflamatorios IL-6 (**Figura 21A**), MCP1 (**Figura 21B**), IL-10 (**Figura 21C**) e IFN-gamma (**Figura 21D**).

Figuras 22-23 muestran el perfil de transcripción de isquiotibiales de ratas con inducción de estatinas. Estos resultados revelaron que la expresión de diversos genes relacionados con adhesión, desarrollo y fibrosis se vieron modificados por el tratamiento con HRS(1-506).

- 15 **Figuras 24-25** muestran el perfil de transcripción de isquiotibiales de ratas con inducción de estatinas. Estos resultados revelaron que la expresión de diversos genes asociados con degeneración muscular, atrofia y miogenia se vieron modificados por el tratamiento con HRS(1-506). **Figura 24B** muestra los resultados para MMP3, y **Figura 24C** muestra los resultados para MMP9.

- 20 **Figuras 26A-26B** muestran los efectos de HRS(1-506) en el modelo de ratón *mdx* de distrofia muscular de Duchenne (DMD). Se observaron reducciones en suero de CK (**Figura 26A**), AST (**Figura 26B**) y LDH (**Figura 26C**) en ratones tratados con HRS(1-506) o dexametasona con respecto a los controles de vehículo.

- 25 **Figuras 27A-27B** muestran los efectos de inmunización con HRS de ratón (mHRS) de longitud completa en ratones SJL/J. Estos ratones tienen una delección en marco de 171 pb en la unión 3' de splicing del exón 45 de disferlina y desarrollan miopatía espontánea que se asocia con inflamación muscular. Los ratones proporcionan un modelo genético de miopatías humanas con deficiencia de disferlina, tales como distrofia muscular de cintura y miembros tipo 2B (DMCM2B). **Figura 27A** muestra que los ratones SJL/J inmunizados con mHisRS subcutáneamente generaron una robusta respuesta de anticuerpos a HisRS de longitud completa. Tal como se muestra en la **Figura 27B**, el tejido muscular de ratones inmunizados para HisRS mostró regiones de infiltrado celular y miositis, y en concordancia con esta histopatología, dos ratones inmunizados mostraron signos de miositis.

- Figuras 28A-28B** muestran un análisis por fluorimetría de barrido diferencial (DSF) de HRS de longitud completa y HRS(1-506). **Figura 28A** muestra que había dos transiciones térmicas para HRS de longitud completa tras la incubación a pH 7-7,5; la primera transición tuvo lugar a 48°C tal como indica la flecha, y la transición principal ocurrió a ~54°C. **Figura 28B** muestra la estabilidad térmica o temperatura de fusión de HRS(1-506) en un intervalo de concentraciones de tampón de histidina. Los resultados revelan que el tampón de histidina es capaz de estabilizar significativamente la conformación de polipéptidos de HRS tales como HRS(1-506).

40 BREVE RESUMEN

- Las realizaciones de la presente descripción se basan en parte en el sorprendente descubrimiento de que bloquear específicamente la actividad, unión o producción de anticuerpos anti-Jo-1 por lo demás patógenos (también denominados anticuerpos Jo-1), por ejemplo, con polipéptidos de HRS u otros agentes de bloqueo específicos de anticuerpos, puede ser útil en el tratamiento de sujetos con enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias, y puede prevenir, o retrasar significativamente, la progresión de la enfermedad. Una ventaja de este descubrimiento es que el impacto negativo de los anticuerpos anti-Jo-1 puede superarse con un debilitamiento escaso o nulo del sistema inmunitario del sujeto, produciendo perfiles de efectos secundarios significativamente reducidos. Por otra parte, el enfoque es aplicable en sentido extenso a otras enfermedades que incluyen enfermedades y trastornos inflamatorios relacionados en los que existe una insuficiencia local o temporal de histidil-tRNA sintetasa.

- Por consiguiente, algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a composiciones terapéuticas, que comprenden un polipéptido de histidil-tRNA sintetasa (HRS) de aproximadamente 20-90 aminoácidos de longitud que es idéntico en al menos el 90% a la SEQ ID NO: 1, donde la composición/polipéptido de HRS: a) es de al menos aproximadamente el 95% de pureza; b) tiene menos de aproximadamente el 5% de agregación; y c) está libre sustancialmente de endotoxinas. En algunas realizaciones de la presente descripción, al menos 20 aminoácidos del polipéptido de HRS son de la región definida por los residuos 1-67 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones de la presente descripción, al menos 40 aminoácidos del polipéptido de HRS son de la región definida por los residuos 1-67 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones de la presente descripción, al menos 60 aminoácidos del polipéptido de HRS son de la región definida por los residuos 1-67 de la SEQ ID NO: 1.

- Se incluyen también composiciones terapéuticas, que comprenden un polipéptido de histidil-tRNA sintetasa (HRS) de al menos aproximadamente 400 aminoácidos de longitud que comprende 80 o más aminoácidos contiguos que son idénticos al menos en el 90% a la SEQ ID NO: 1, donde la composición/polipéptido de HRS: a) es de al menos
- 5 aproximadamente el 95% de pureza; b) tiene menos de aproximadamente el 5% de agregación; y c) está libre sustancialmente de endotoxinas. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende 200 o más aminoácidos que son idénticos al menos en el 90% a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende 400 o más aminoácidos que son idénticos al menos en el 90% a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido
- 10 de HRS tiene al menos aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende la secuencia de HRS humana de longitud completa (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS está truncado en el residuo 505 (HRS(1-505)) o 506 (HRS(1-506)) de la SEQ ID NO: 1.
- 15 Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a composiciones terapéuticas, que comprenden un polipéptido de histidil-tRNA sintetasa (HRS) de al menos aproximadamente 400 aminoácidos de longitud que es idéntico en al menos el 90% a la SEQ ID NO: 1, donde la composición/polipéptido de HRS: a) es de al menos aproximadamente el 95% de pureza; b) tiene menos de aproximadamente el 5% de agregación; y c) está libre sustancialmente de endotoxinas. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene al
- 20 menos aproximadamente 500 aminoácidos de longitud y es idéntico en al menos el 90% a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 (HRS humana de longitud completa). En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS está truncado en el residuo 505 (HRS(1-505)) o 506 (HRS(1-506)) de la SEQ ID NO: 1.
- 25 Se incluyen también composiciones terapéuticas, que comprenden un polipéptido de histidil-tRNA sintetasa (HRS) de 500-506 aminoácidos de longitud que es al menos idéntico en el 90% a la SEQ ID NO: 70 (HRS(1-506)) y carece de los residuos 507-509 de la SEQ ID NO: 1, donde la composición/polipéptido de HRS: a) es de al menos aproximadamente el 95% de pureza; b) tiene menos de aproximadamente el 5% de agregación; y c) está libre sustancialmente de endotoxinas. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene
- 30 505-506 aminoácidos de longitud y es idéntico en al menos el 90% a la SEQ ID NO: 70. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene 506 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende la SEQ ID NO: 70. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 70. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS consiste en la SEQ ID NO: 70. En algunas realizaciones de la presente
- 35 descripción, el polipéptido de HRS tiene 505 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende los residuos 2-506 de la SEQ ID NO: 70 (HRS(2-506)). En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS consiste esencialmente en los residuos 2-506 de la SEQ ID NO: 70 (HRS(2-506)). En realizaciones específicas de la presente descripción, el polipéptido de HRS consiste en los residuos 2-506 de la SEQ ID NO: 70 (HRS(2-506)).
- 40 En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una mutación de al menos un residuo de cisteína. En algunas realizaciones de la presente descripción, el al menos un residuo de cisteína se selecciona de entre Cys174, Cys191, Cys224, Cys235 y Cys455.
- 45 En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS (por ejemplo, que carece de los residuos 507-509 de la SEQ ID NO: 1) tiene actividad biológica, estabilidad y/u homogeneidad mayores que un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 (HRS humana de longitud completa) en condiciones comparables, comprendidas entre aproximadamente 4-40°C, y un pH de aproximadamente 6,0-8,0. En algunas realizaciones de la presente descripción, las condiciones incluyen una temperatura de aproximadamente 20-25°C (temperatura ambiente) y un
- 50 pH de aproximadamente 7,0-7,5, opcionalmente durante un periodo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días. En algunas realizaciones de la presente descripción, las condiciones incluyen una temperatura de aproximadamente 37°C y un pH de aproximadamente 7,0-7,5, opcionalmente durante un periodo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días.
- 55 En algunas realizaciones de la presente descripción, el aumento de actividad comprende un incremento absoluto en una actividad biológica no canónica de al menos aproximadamente el 10%. En algunas realizaciones de la presente descripción, la actividad no canónica es una actividad antiinflamatoria o unión específica a un anticuerpo anti-Jo-1. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene formación de disulfuro intercadena reducida en condiciones reducidas con respecto al polipéptido de la SEQ ID NO: 1 (HRS de longitud completa). En
- 60 algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una heterogeneidad (carga) reducida con respecto al polipéptido de la SEQ ID NO: 1 (HRS de longitud completa). En algunas realizaciones de la presente

descripción, el polipéptido de HRS tiene una formación reducida de agregados de peso molecular alto en solución con respecto al polipéptido de la SEQ ID NO: 1 (HRS de longitud completa). En algunas realizaciones de la presente descripción, el aumento de homogeneidad comprende un incremento de al menos el 10% en la monodispersión del polipéptido de HRS con respecto al polipéptido de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene un mayor rendimiento de proteínas solubles tras la producción recombinante en *E. coli* con respecto al polipéptido de la SEQ ID NO: 1 (HRS de longitud completa).

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS se fusiona con una contraparte de fusión heteróloga, opcionalmente un ligando de linfocitos T. En realizaciones particulares de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende al menos un aminoácido D.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición terapéutica comprende un tampón a una concentración comprendida desde aproximadamente 0,03 mM a aproximadamente 100 mM. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición terapéutica comprende un tampón a una concentración comprendida desde aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición terapéutica comprende un tampón a una concentración comprendida desde aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición terapéutica comprende un tampón a una concentración comprendida desde aproximadamente 45 mM a aproximadamente 55 mM. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición terapéutica comprende un tampón a una concentración de aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones de la presente descripción, el tampón es un tampón de histidina, un tampón de citrato o un tampón de fosfato.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el tampón es un tampón de histidina, y donde el polipéptido de HRS tiene una estabilidad mayor que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable sin dicho tampón de histidina, en condiciones comparables, comprendidas entre aproximadamente 4-40°C, y un pH de aproximadamente 7,0-7,5.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el tampón es un tampón de citrato, y donde el polipéptido de HRS tiene una estabilidad mayor que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable sin dicho tampón de citrato, en condiciones comparables, comprendidas entre aproximadamente 4-40°C, y un pH de aproximadamente 6,5-7,5.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el tampón es un tampón de fosfato, y donde el polipéptido de HRS tiene una estabilidad mayor que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable sin dicho tampón de fosfato, en condiciones comparables, comprendidas entre aproximadamente 4-40°C, y un pH de aproximadamente 7,0-7,5.

En algunas realizaciones de la presente descripción, las condiciones (por ejemplo, para comparación) incluyen una temperatura de aproximadamente 5°C, opcionalmente durante un periodo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días. En algunas realizaciones de la presente descripción, las condiciones incluyen una temperatura de aproximadamente 20-25°C (temperatura ambiente), opcionalmente durante un periodo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días. En algunas realizaciones de la presente descripción, las condiciones incluyen una temperatura de aproximadamente 37°C, opcionalmente durante un periodo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el aumento de estabilidad comprende una estabilidad térmica, donde la temperatura de fusión (T_f) del polipéptido de HRS es al menos aproximadamente 5°C mayor que la del polipéptido de HRS correspondiente en la composición sin dicho tampón y/o fuera de dicho intervalo de pH. En algunas realizaciones de la presente descripción, el aumento de estabilidad comprende una estabilidad térmica, donde la temperatura de fusión del polipéptido de HRS se desarrolla a una velocidad que es al menos el 10% más lenta que la del polipéptido de HRS correspondiente en la composición sin dicho tampón y/o fuera de dicho intervalo de pH.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición tiene agregación y/o precipitación reducidas con respecto a una composición sin dicho tampón y/o fuera de dicho intervalo de pH, en condiciones por lo demás comparables. En algunas realizaciones de la presente descripción, la agregación se reduce al menos aproximadamente en el 10% medida por absorbancia a A340. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición tiene menos agregados de peso molecular alto que una composición sin dicho tampón y/o fuera de dicho intervalo de pH, en condiciones por lo demás comparables.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el tampón es un tampón de histidina, y el polipéptido de HRS es idéntico en al menos el 90% a los residuos 1-506 ó 2-506 de la SEQ ID NO: 1 y carece de los residuos 507-509

de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones de la presente descripción, el tampón es un tampón de citrato, y el polipéptido de HRS es idéntico en al menos el 90% a los residuos 1-506 ó 2-506 de la SEQ ID NO: 1 y carece de los residuos 507-509 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS es HRS(1-506) o HRS(2-506).

- 5
- En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende cloruro de sodio (NaCl) a una concentración comprendida desde aproximadamente 100-300 mM, opcionalmente a aproximadamente 140 mM-240 mM, u opcionalmente a aproximadamente 140 mM. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS es idéntico en al menos el 90% a los residuos 1-506 ó 2-506 de la SEQ ID NO: 1 y carece de los
- 10 residuos 507-509 de la SEQ ID NO: 1, donde opcionalmente el polipéptido de HRS tiene una temperatura de fusión (Tf) de al menos aproximadamente 60°C. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS es HRS(1-506) o HRS(2-506), donde opcionalmente el polipéptido de HRS tiene una temperatura de fusión (Tf) de al menos aproximadamente 60°C.
- 15 En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones de la presente descripción, el uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables se seleccionan de entre sacarosa, manitol, trehalosa, sorbitol, arginina, glicina y glicerol. En algunas realizaciones de la presente descripción, el uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables están a una concentración comprendida desde aproximadamente el 0,2 al 5,0%. En algunas
- 20 realizaciones de la presente descripción, el excipiente farmacéuticamente aceptable tiene aproximadamente el 1-3% de sacarosa, opcionalmente aproximadamente el 2% de sacarosa. En algunas realizaciones de la presente descripción, el excipiente farmacéuticamente aceptable tiene aproximadamente el 1-3% de trehalosa, opcionalmente aproximadamente el 2% de trehalosa.
- 25 En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende uno o más tensioactivos. En algunas realizaciones de la presente descripción, el tensioactivo es un polisorbato o un poloxámero. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polisorbato es polisorbato 20 (PS20), polisorbato 40 (PS40), polisorbato 60 (PS60) o polisorbato 80 (PS80). En algunas realizaciones de la presente descripción, el polisorbato es PS20. En algunas realizaciones de la presente descripción, el poloxámero es Pluronic F68. En algunas realizaciones de la
- 30 presente descripción, el tensioactivo está presente en un intervalo de aproximadamente el 0,1-5,0% (p/v). En algunas realizaciones de la presente descripción, es aproximadamente el 0,05% (p/v) de PS20.
- En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende uno o más compuestos antioxidantes o agentes reductores. En algunas realizaciones de la presente descripción, el compuesto antioxidante
- 35 o agente reductor se selecciona de entre cisteína, metionina y N-acetilcisteína (NAC). En algunas realizaciones de la presente descripción, el compuesto antioxidante o agente reductor está presente en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,1-5,0 mM.
- En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende uno o más agentes de quelación.
- 40 En algunas realizaciones de la presente descripción, el agente de quelación es etilendiamintetraacetato (EDTA). En algunas realizaciones de la presente descripción, el agente de quelación está presente en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,1-2,0 mM.
- En algunas composiciones, el polipéptido de HRS está presente en una concentración de al menos
- 45 aproximadamente 10 mg/ml. En algunas composiciones, el polipéptido de HRS está presente en una concentración de al menos aproximadamente 25 mg/ml. En algunas composiciones, el polipéptido de HRS está presente en una concentración de al menos aproximadamente 50 mg/ml.
- En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición tiene una turbiedad de menos de
- 50 aproximadamente 0,5 medida por absorbancia a A340. En algunas realizaciones de la presente descripción, la absorbancia a A340 se mide después de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días de incubación a 37°C. En algunas realizaciones de la presente descripción, la absorbancia a A340 se mide después de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días de incubación a temperatura ambiente. En algunas realizaciones de la presente descripción, la absorbancia a A340 se mide después de la congelación/descongelación de la composición
- 55 al menos 1, 2, 3, 4 ó 5 veces.
- En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición tiene una opalescencia de menos de aproximadamente 0,6 medida por absorbancia a A580. En algunas realizaciones de la presente descripción, la absorbancia a A580 se mide después de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días de incubación a 37°C.
- 60 En algunas realizaciones de la presente descripción, la absorbancia a A580 se mide después de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días de incubación a temperatura ambiente. En algunas realizaciones de la

presente descripción, la absorbancia a A580 se mide después de la congelación/descongelación de la composición al menos 1, 2, 3, 4 ó 5 veces.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición tiene menos de aproximadamente el 3% de agregados de peso molecular alto. En algunas realizaciones de la presente descripción, la agregación de peso molecular alto (APM) se mide después de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días de incubación a 37°C. En algunas realizaciones de la presente descripción, la agregación de peso molecular alto (APM) se mide después de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días de incubación a temperatura ambiente. En algunas realizaciones de la presente descripción, la agregación de peso molecular alto se mide después de la congelación/descongelación de la composición al menos 1, 2, 3, 4 ó 5 veces.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una temperatura de fusión (Tf) en la composición de al menos aproximadamente 50°C. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una temperatura de fusión (Tf) en la composición de al menos aproximadamente 55°C. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una temperatura de fusión (Tf) en la composición de al menos aproximadamente 60°C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una monodispersión de al menos aproximadamente el 90% o el 95%.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende L-histidina aproximadamente 50 mM, NaCl aproximadamente 140 mM, trehalosa aproximadamente al 2%, Polisorbato 20 (PS20) aproximadamente al 0,05%, y tiene un pH de aproximadamente 7,0-7,4. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende L-histidina aproximadamente 50 mM, NaCl aproximadamente 140 mM, sacarosa aproximadamente al 2%, Polisorbato 20 (PS20) aproximadamente al 0,05%, y tiene un pH de aproximadamente 7,0-7,4. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS es HRS(1-506) o HRS(2-506) y tiene una temperatura de fusión (Tf) en la composición de al menos aproximadamente 60°C. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición tiene una turbiedad de menos de aproximadamente 0,1, o inferior a aproximadamente 0,05, medida por absorbancia a A340. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición tiene una opalescencia de menos de aproximadamente 0,1, o inferior a aproximadamente 0,05, medida por absorbancia a A580. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición tiene menos de aproximadamente el 2%, o menos de aproximadamente el 1%, de agregados de peso molecular alto.

En algunas realizaciones la presente descripción incluye una composición médicamente útil que comprende un polipéptido de entre aproximadamente 20 y 90 aminoácidos con al menos el 90% de identidad con HRS humana (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones de la presente descripción, al menos 20-40 aminoácidos están dentro de los aminoácidos 1-67 de HRS humana (SEQ ID NO: 1). En realizaciones particulares de la presente descripción, al menos un aminoácido es un aminoácido D. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido: a) es de al menos aproximadamente el 95% de pureza; b) tiene menos de aproximadamente el 5% de agregación; y c) está sustancialmente libre de endotoxinas

En otra realización la presente descripción incluye una composición médicamente útil que comprende un polipéptido de al menos aproximadamente 400 aminoácidos de un polipéptido de HRS; donde el polipéptido: a) es de al menos aproximadamente el 95% de pureza; b) tiene menos de aproximadamente el 5% de agregación; y c) está sustancialmente libre de endotoxinas.

En otra realización la presente descripción incluye una composición médicamente útil que comprende un polipéptido de al menos aproximadamente 400 aminoácidos; donde el polipéptido es: a) al menos un 80% idéntico a la HRS humana (SEQ ID NO: 1); b) tiene al menos aproximadamente el 95% de pureza; c) tiene menos de aproximadamente el 5% de agregación; y d) está sustancialmente libre de endotoxinas.

En algunos aspectos de la presente descripción, de cualquiera de estas composiciones terapéuticas o médicamente útiles, el polipéptido comprende un polipéptido de HRS de longitud completa. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS está truncado aproximadamente en el residuo 505 ó 506. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene al menos una mutación en un residuo de cisteína. En algunos aspectos de la presente descripción, el residuo de cisteína se selecciona de entre Cys174, Cys191, Cys224, Cys235, Cys455, Cys507 y Cys509. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido comprende al menos un aminoácido D. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido comprende un dominio WHEP. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 80% a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182, o una secuencia de aminoácidos enumerada en o deducible a partir de cualquiera de las Tablas 1-9. En algunos

aspectos de la presente descripción, el polipéptido se fusiona con una proteína heteróloga. En algunos aspectos de la presente descripción, la proteína heteróloga comprende un ligando de linfocitos T. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición se formula para el suministro por medio de administración oral, intranasal, pulmonar o parenteral.

5

En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica médicamente útil está destinada a su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, miopatías inflamatorias, que incluyen miopatías inflamatorias (idiopáticas), polimiositis, dermatomiositis y trastornos relacionados, solapamiento de polimiositis-esclerodermia, miositis de cuerpos de inclusión (MCI), síndrome anti-sintetasa, enfermedad pulmonar intersticial, artritis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Perrault y síndrome de Usher. En algunos aspectos de la presente descripción, el epítipo es un epítipo inmunodominante reconocido por anticuerpos en los sueros del sujeto. En algunos aspectos, el polipéptido de HRS se une a una molécula del complejo de histocompatibilidad humana (MHC) de clase I o clase II. En algunos aspectos de la presente descripción, el ácido nucleico está acoplado operativamente con secuencias de control de expresión, y donde la expresión del ácido nucleico provoca tolerización. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica comprende el suministro de un vehículo seleccionado de entre el grupo que consiste en liposomas, micelas, emulsiones y células.

En otra realización la presente descripción incluye una composición terapéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con una insuficiencia de histidil-tRNA sintetasa, que comprende al menos un polipéptido de HRS, donde el polipéptido de HRS es capaz de sustituir al menos una función canónica o no canónica de la histidil-tRNA sintetasa. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS no compite significativamente con unión de autoanticuerpos asociados a la enfermedad con la histidil-tRNA sintetasa en un ensayo ELISA competitivo hasta una concentración de aproximadamente 5×10^{-7} M.

25

En otra realización la presente descripción incluye una composición terapéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con un autoanticuerpo específico para histidil-tRNA sintetasa, que comprende al menos un polipéptido de HRS donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo reconocido específicamente por el autoanticuerpo, y donde el polipéptido de HRS es capaz de provocar tolerización.

30

En otra realización la presente descripción incluye una composición terapéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con un autoanticuerpo específico para histidil-tRNA sintetasa, comprendiendo la composición un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS de mamífero, donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo reconocido específicamente por el autoanticuerpo, y donde el ácido nucleico está acoplado operativamente con secuencias de control de expresión, y donde la expresión del ácido nucleico provoca tolerización.

35

En otra realización la presente descripción incluye una composición terapéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con un autoanticuerpo específico para histidil-tRNA sintetasa, comprendiendo la composición una célula hospedadora recombinante, donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo que comprende al menos un epítipo reconocido específicamente por el autoanticuerpo, y donde el ácido nucleico está acoplado operativamente con secuencias de control de expresión para facilitar la expresión de la HRS en la célula hospedadora.

40

En otra realización la presente descripción incluye una composición terapéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con un autoanticuerpo específico para histidil-tRNA sintetasa, comprendiendo la composición un anticuerpo o una proteína de unión específicos para el autoanticuerpo, donde el anticuerpo o proteína de unión bloquea la unión del autoanticuerpo a la histidil-tRNA sintetasa natural.

45

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a composiciones terapéuticas para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que comprende al menos un polipéptido de HRS, donde el polipéptido de HRS tiene al menos una actividad no canónica.

50

Se incluyen también composiciones terapéuticas para su uso en el tratamiento de una distrofia muscular que comprende al menos un polipéptido de HRS, donde el polipéptido de HRS tiene al menos una actividad no canónica. En algunos aspectos de la presente descripción, la distrofia muscular se selecciona de entre distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular de cinturas y miembros, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia miotónica, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular distal y distrofia muscular congénita.

55

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen composiciones terapéuticas para su uso en el tratamiento

60

de rabdomiólisis, degeneración muscular, caquexia, inflamación muscular o lesión muscular que comprende al menos un polipéptido de HRS, donde el polipéptido de HRS tiene al menos una actividad no canónica.

En otra realización la presente descripción incluye el uso de un polipéptido de HRS en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria. En otra realización la presente descripción incluye el uso de un polipéptido de HRS en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con una insuficiencia de histidil-tRNA sintetasa.

En algunos aspectos de la presente descripción, de cualquiera de estas composiciones o usos terapéuticos, el polipéptido de HRS induce tolerancia. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene de aproximadamente 60 a aproximadamente 120 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene de aproximadamente 120 a aproximadamente 200 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene longitud completa. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS está truncado aproximadamente en el residuo 505 ó 506. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene al menos una mutación en un residuo de cisteína. En algunos aspectos de la presente descripción, el residuo de cisteína se selecciona de entre Cys174, Cys191, C224, Cys235, Cys455, Cys507 y Cys509. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende al menos un aminoácido D. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende un dominio WHEP. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 80% a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182, o una secuencia de aminoácidos al menos el 80%, el 90% o el 95% idéntica a cualquiera de las secuencias de las **Tablas D1, D3-D6 o D8**. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS se fusiona con una proteína heteróloga. En algunos aspectos de la presente descripción, la proteína heteróloga comprende un ligando de linfocitos T. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición se formula para el suministro por medio de administración oral, intranasal, pulmonar o parenteral. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica comprende el suministro de un vehículo seleccionado de entre el grupo que consiste en liposomas, micelas, emulsiones y células.

Se incluyen también procedimientos de tratamiento de una enfermedad asociada con un autoanticuerpo que comprende la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición terapéutica que comprende uno o más de entre a) un polipéptido de HRS, b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, c) una célula hospedadora recombinante, donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo, o d) un anticuerpo o proteína de unión específica al autoanticuerpo.

En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica se administra al sujeto antes de la aparición de síntomas de la enfermedad. En algunos aspectos de la presente descripción el autoanticuerpo es específico para histidil-tRNA sintetasa. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo de la histidil-tRNA sintetasa reconocido por el autoanticuerpo específico de la enfermedad. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS bloquea la unión del autoanticuerpo con histidil-tRNA sintetasa natural. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS provoca delección clonal de linfocitos T autorreactivos. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS provoca inactivación funcional de los linfocitos T implicados en la respuesta autoinmunitaria. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS produce una reducción de la inflamación muscular o pulmonar. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS induce tolerancia. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene de aproximadamente 60 a aproximadamente 120 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene de aproximadamente 120 a aproximadamente 200 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene longitud completa. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS está truncado aproximadamente en el residuo 505 ó 506. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene al menos una mutación en un residuo de cisteína. En algunos aspectos de la presente descripción, el residuo de cisteína se selecciona de entre Cys174, Cys191, Cys224, Cys235, C455, Cys507 y Cys509. En algunos aspectos de la presente descripción, los residuos 507, 508 y 509 correspondientes a HRS de longitud completa (SEQ ID NO: 1) están suprimidos. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende al menos un aminoácido D. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende un dominio WHEP. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 80% a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182, o una secuencia de aminoácidos al menos el 80%, el 90% o el 95% idéntica a cualquiera de las secuencias de las **Tablas D1, D3-D6 o**

D8. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS se fusiona con una proteína heteróloga. En algunos aspectos de la presente descripción, la proteína heteróloga comprende un ligando de linfocitos T. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición se formula para el suministro por medio de administración oral, intranasal, pulmonar o parenteral.

5

En algunos aspectos de la presente descripción, la enfermedad se selecciona de entre el grupo que consiste en miopatías inflamatorias, que incluye miopatías inflamatorias, polimiositis, dermatomiositis y trastornos relacionados, solapamiento de polimiositis-esclerodermia, miositis de cuerpos de inclusión (MCI), síndrome anti-sintetasa, enfermedad pulmonar intersticial, artritis y fenómeno de Raynaud, entre otras enfermedades o dolencias descritas en la presente memoria. En algunos aspectos de la presente descripción, el epítipo es epítipo inmunodominante reconocido por los anticuerpos en los sueros del sujeto. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS se une a una molécula de complejo de histocompatibilidad humana (MHC) clase II. En algunos aspectos de la presente descripción, el ácido nucleico está acoplado operativamente con secuencias de control de expresión, y donde la expresión del ácido nucleico provoca tolerización. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica comprende el suministro de un vehículo seleccionado de entre el grupo que consiste en liposomas, micelas, emulsiones y células.

Se incluyen también procedimientos de reducción de la inflamación de los tejidos que comprende la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre a) un polipéptido de HRS, b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o c) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo. En algunos aspectos de la presente descripción, el tejido se selecciona de entre músculo, pulmón y piel.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a procedimientos de reducción de la inflamación muscular o pulmonar comprendiendo dicho procedimiento la administración a un sujeto de una composición terapéutica que comprende uno o más de entre: a) un polipéptido de HRS; b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo; o c) una célula hospedadora recombinante, donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo.

Se incluyen también procedimientos de tratamiento de una distrofia muscular que comprende la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre a) un polipéptido de HRS, b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o c) una célula hospedadora recombinante, donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo. En algunos aspectos de la presente descripción, la distrofia muscular se selecciona de entre distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular de cinturas y miembros, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia miotónica, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular distal y distrofia muscular congénita.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a procedimientos de tratamiento de rabdomiólisis, degeneración muscular, caquexia, inflamación muscular o lesión muscular que comprenden la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre a) un polipéptido de HRS, b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o c) una célula hospedadora recombinante, donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo.

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos para inducir tolerancia a un autoantígeno de histidil-tRNA sintetasa (HisRS), comprendiendo dicho procedimiento la administración a un sujeto de una composición terapéutica que comprende uno o más de entre: a) un polipéptido de HRS, b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo; o c) una célula hospedadora recombinante, donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo, donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo reconocido específicamente por el autoanticuerpo, y donde la administración de la composición provoca tolerización al autoantígeno.

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos para eliminar un conjunto o subconjunto de linfocitos T implicados en una respuesta autoinmunitaria a un autoantígeno de histidil-tRNA sintetasa (HisRS), comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto de una composición terapéutica de uno o más de entre: a) un polipéptido de HRS; b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo; o c) una célula hospedadora recombinante, donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo, donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo reconocido específicamente por el autoanticuerpo, y donde la administración de la composición provoca delección clonal de linfocitos T autorreactivos.

60

Se incluyen también procedimientos para inducción de anergia en linfocitos T implicados en una respuesta

autoinmunitaria a un autoantígeno de histidil-tRNA sintetasa (HisRS), comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto de una composición que comprende uno o más de entre: a) un polipéptido de HRS; b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo; o c) una célula hospedadora recombinante, donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo, donde el

5 polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo reconocido específicamente por el autoanticuerpo, y donde la administración de la composición provoca inactivación funcional de los linfocitos T implicados en la respuesta autoinmunitaria.

Algunas realizaciones de la presente descripción comprenden terapias de sustitución para tratar una enfermedad

10 asociada con una insuficiencia de histidil-tRNA sintetasa que comprende la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición terapéutica que comprende uno o más de entre: a) un polipéptido de HRS; b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo; c) una célula hospedadora recombinante, donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo; o d) un anticuerpo o proteína de unión específica al autoanticuerpo; donde el polipéptido de HRS funcionalmente compensa la insuficiencia a la

15 histidil-tRNA sintetasa.

Se incluyen también procedimientos para tratar una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria, que comprende la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición terapéutica que comprende al menos un polipéptido de HRS.

20 En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS no compite significativamente por autoanticuerpos asociados a la enfermedad que se unen a histidil-tRNA sintetasa en un ensayo ELISA competitivo hasta una concentración de aproximadamente 5×10^{-7} M.

25 En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene de aproximadamente 60 a aproximadamente 120 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene de aproximadamente 120 a aproximadamente 200 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene de aproximadamente 200 a

30 aproximadamente 400 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene de aproximadamente 400 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene longitud completa. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS está truncado aproximadamente en el residuo 505 ó 506. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene al menos una mutación en un residuo de cisteína. En algunos

35 aspectos de la presente descripción, el residuo de cisteína se selecciona de entre Cys174, Cys191, Cys224, Cys235, C455, Cys507 y Cys509. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende al menos un aminoácido D. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende un dominio WHEP. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 80% a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71,

40 74-153, 160-172 ó 176-182, o una secuencia de aminoácidos al menos el 80%, el 90% o el 95% idéntica a cualquiera de las secuencias de las **Tablas D1, D3-D6, o D8**. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS se fusiona con una proteína heteróloga. En algunos aspectos de la presente descripción, la proteína heteróloga comprende un ligando de linfocitos T. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición se formula para el suministro por medio de administración oral, intranasal, pulmonar o parenteral. En

45 algunos aspectos de la presente descripción, la enfermedad se selecciona de entre el grupo que consiste en miopatías inflamatorias, que incluye miopatías inflamatorias, polimiositis, dermatomiositis y trastornos relacionados, solapamiento de polimiositis-esclerodermia, miositis de cuerpos de inclusión (MCI), síndrome anti-sintetasa, enfermedad pulmonar intersticial, artritis y fenómeno de Raynaud. En algunos aspectos de la presente descripción, el epítipo es un epítipo inmunodominante reconocido por los anticuerpos en los sueros del sujeto. En algunos

50 aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS se une a una molécula de complejo de histocompatibilidad humana (MHC) de clase II. En algunos aspectos de la presente descripción, el ácido nucleico está acoplado operativamente con secuencias de control de expresión, y donde la expresión del ácido nucleico provoca tolerización. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica comprende el suministro de un vehículo seleccionado de entre el grupo que consiste en liposomas, micelas, emulsiones y células.

55 Se incluyen también procedimientos de determinación de presencia o niveles de un polipéptido de HRS, o fragmentos de los mismos en una muestra, que comprende la puesta en contacto de la muestra con uno o más agentes de unión que se unen específicamente al polipéptido de HRS y la detección de la presencia o ausencia del agente de unión, y determinando así la presencia o los niveles del polipéptido de HRS.

60 Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de determinación de la especificidad del

epítipo de un anticuerpo anti-polipéptido de HRS para un polipéptido de HRS específico, comprendiendo el procedimiento la puesta en contacto del anticuerpo con uno o más polipéptidos de HRS, y la detección de la presencia o ausencia del agente de unión, y determinando así la especificidad del epítipo del anticuerpo. En algunos aspectos de la presente descripción de este procedimiento, el polipéptido de HRS es de hasta 5 aproximadamente 80 aminoácidos de longitud y comprende el dominio WHEP.

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos para tratar enfermedades asociadas con un autoanticuerpo específico para histidil-tRNA sintetasa, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición terapéutica que comprende al menos un polipéptido de HRS donde 10 el polipéptido de HRS no compite significativamente por autoanticuerpos asociados a la enfermedad que se unen a histidil-tRNA sintetasa en un ensayo ELISA competitivo hasta una concentración de aproximadamente 1×10^{-7} M.

En otro aspecto de la presente descripción, los polipéptidos de HRS pueden usarse para el perfil de pacientes para identificar su carga de enfermedad de anticuerpos Jo-1. Dichos perfiles permiten la selección de pacientes en 15 subpoblaciones que se beneficiarían del tratamiento con polipéptido de HRS, pronostican el probable resultado terapéutico y/o identifican el o los polipéptidos de HRS más adecuados para su uso como agentes terapéuticos.

Por consiguiente, algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a procedimientos para identificar a un sujeto humano en riesgo de sufrir una respuesta inmunitaria adversa a la administración del polipéptido de HRS, que 20 comprende a) la determinación del nivel de anticuerpos, o la especificidad del epítipo del anticuerpo anti-histidil-tRNA sintetasa en el sujeto; y b) la identificación del sujeto como en riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria adversa a la administración del polipéptido de HRS si el sujeto tiene anticuerpos detectables para histidil-tRNA sintetasa, o el polipéptido de HRS. En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como en riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria adversa a la administración del polipéptido de HRS si el 25 sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de más de aproximadamente 2 micromolar. En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como de alto riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria adversa a la administración del polipéptido de HRS si el sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de más de aproximadamente 4 micromolar.

30 Se incluyen también procedimientos para seleccionar un polipéptido de HRS con el fin de tratar a un sujeto humano con una afección autoinmunitaria o inflamatoria, que comprende a) la determinación del nivel de anticuerpos, o la especificidad del epítipo del anticuerpo anti-histidil-tRNA sintetasa en el sujeto; y b) la selección de un polipéptido de HRS que tiene una menor afinidad por el anticuerpo anti-histidil-tRNA sintetasa en comparación con histidil-tRNA sintetasa de tipo no mutado.

35 Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a procedimientos para pronóstico de la progresión de la enfermedad en un sujeto humano, que comprende a) la determinación del nivel de anticuerpos, o especificidad del epítipo del anticuerpo anti-histidil-tRNA sintetasa en el sujeto; y b) la identificación del sujeto como en riesgo de desarrollar una enfermedad más grave si el sujeto tiene anticuerpos detectables para histidil-tRNA sintetasa, o el 40 polipéptido de HRS.

Se incluyen también procedimientos para predecir las respuestas del sujeto a la administración del polipéptido de HRS, que comprende a) la determinación del nivel de anticuerpos, o especificidad del epítipo del anticuerpo anti-histidil-tRNA sintetasa en el sujeto; y b) la identificación del sujeto como adecuado para la administración del 45 polipéptido de HRS si el sujeto no tiene anticuerpos detectables para histidil-tRNA sintetasa, o el polipéptido de HRS.

En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como adecuado para la administración del polipéptido de HRS si el sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de 50 menos de aproximadamente 1 micromolar.

En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como adecuado para la administración del polipéptido de HRS si el sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de 55 menos de aproximadamente 0,1 micromolar.

En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como adecuado para la administración del polipéptido de HRS si el sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de 60 más de aproximadamente 0,01 micromolar.

Se incluyen también procedimientos para inmunoadsorción extracorpórea de anticuerpos de anti-histidil-tRNA sintetasa (HRS) a partir de un fluido corporal extracelular, que comprende (a) el suministro del fluido corporal 65 extracelular que se ha obtenido de un sujeto, la puesta en contacto del fluido corporal extracelular con un soporte

sólido biocompatible que tiene al menos un polipéptido de histidil-tRNA sintetasa unido al mismo, capturando así los anticuerpos anti-HRS en el soporte sólido, y (c) la reinfusión del fluido corporal extracelular de la etapa (b) en el sujeto. En algunos aspectos de la presente descripción, los anticuerpos anti-HRS incluyen un anticuerpo anti-Jo-1.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones.

La práctica de la presente descripción empleará, salvo que se indique expresamente lo contrario, procedimientos convencionales de biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de los conocimientos de la técnica, muchos de los cuales se describen más adelante con fines de ilustración. Dichas técnicas se explican de forma completa en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª Edición, 2000); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications* (P. Herdewijn, ed., 2004); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, ed., 1985); *Nucleic Acid Hybridization: Modern Applications* (Buzdin y Lukyanov, ed., 2009); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, ed., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Freshney, R.I. (2005) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 5ª ed. Hoboken NJ, John Wiley & Sons; B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (3ª edición 2010); Farrell, R., *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization* (3ª Edición 2005). *Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications*, ACS, Washington, 1997; Veronese, F., y J.M. Harris, Ed., *Peptide and protein PEGylation, Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(4) 453-609 (2002); Zalipsky, S., y col., "Use of functionalized Poly(Ethylene Glycols) for modification of polypeptides" en *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*. Las publicaciones indicadas anteriormente se proporcionan sólo con fines de descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud.

Definiciones

Salvo que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende normalmente entre los expertos en la materia a los que corresponde la presente descripción. Aunque en la práctica o en la aplicación de la presente invención pueda usarse cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria, se describen los procedimientos y materiales preferidos. Para los fines de la presente descripción, se definen los términos que se muestran a continuación.

Los artículos "**un**" y "**una**" se usan en la presente memoria para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Por "**aproximadamente**" se entiende una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cuantía, peso o longitud que varía en hasta el 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1% con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cuantía, peso o longitud de referencia.

El término "**anergia**" se refiere a la inactivación funcional de una respuesta de linfocitos T o linfocitos B a la reestimulación por antígeno.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "**aminoácido**" pretende significar aminoácidos de origen natural y no natural así como análogos y miméticos de aminoácidos. Los aminoácidos de origen natural incluyen los 20 (L)-aminoácidos usados durante la biosíntesis de proteínas así como otros tales como 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, desmosina, isodesmosina, homocisteína, citrulina y ornitina, por ejemplo. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, por ejemplo, (D)-aminoácidos, norleucina, norvalina, p-fluorofenilalanina, etionina y similares, que son conocidos para un experto en la materia. Los análogos de aminoácidos incluyen formas modificadas de aminoácidos de origen natural y no natural. Dichas modificaciones pueden incluir, por ejemplo, sustitución o reemplazamiento de grupos y fracciones químicos en el aminoácido o por derivación del aminoácido. Los miméticos de aminoácidos incluyen, por ejemplo, estructuras orgánicas que muestran propiedades funcionalmente similares tales como características de carga y separación de carga del aminoácido de referencia. Por ejemplo, una estructura orgánica que emula a la Arginina (Arg o R) tendría una fracción de carga positiva situada en un espacio molecular similar y que tiene el mismo grado de movilidad que el grupo α -amino de la cadena lateral del aminoácido Arg de origen natural. Los miméticos incluyen también estructuras restringidas de manera que mantengan separación e interacciones de carga óptimas del aminoácido o de los grupos funcionales del aminoácido. Los expertos en la materia saben o pueden determinar qué estructuras constituyen análogos de aminoácidos o miméticos de aminoácidos equivalentes.

Tal como se usa en la presente memoria, un sujeto **"en riesgo"** de desarrollar una enfermedad, o una reacción adversa puede tener o no una enfermedad detectable, o síntomas de enfermedad, y puede tener o no una enfermedad detectable o síntomas de enfermedad mostrados antes de los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria. "En riesgo" denota que un sujeto tiene uno o más factores de riesgo, que son parámetros mensurables que guardan relación con el desarrollo de una enfermedad, tal como se describe en la presente memoria y se conoce en la técnica. Un sujeto que tienen uno o más de estos factores de riesgo tiene una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad, o una reacción adversa que un sujeto sin uno o más de estos factores de riesgo.

- 10 Una **"enfermedad autoinmunitaria"** tal como se usa en la presente memoria es una enfermedad o trastorno que procede de o se dirige contra los tejidos del propio individuo. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero no se limitan a, respuestas inflamatorias tales como enfermedades inflamatorias de la piel que incluyen psoriasis y dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); esclerodermia y esclerosis sistémicas; respuestas asociadas con enfermedad inflamatoria intestinal (tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa);
- 15 síndrome de distrés respiratorio (que incluye síndrome de distrés respiratorio del adulto; SADR); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis; colitis; glomerulonefritis; afecciones alérgicas tales como eczema y asma y otras afecciones que implican infiltrado de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia de adhesión de leucocitos; artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (LES); diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes mellitus Tipo I o diabetes mellitus insulino dependiente); esclerosis múltiple; síndrome de Raynaud; tiroiditis autoinmunitaria; encefalomiелitis alérgica; síndrome de Sjögren; diabetes de inicio juvenil; y respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T presentes normalmente en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, miopatías inflamatorias, enfermedad pulmonar intersticial, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que implican diapedesis leucocitaria; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC); síndrome por lesión multiorgánica; anemia hemolítica (que
- 25 incluye, pero no se limita a crioglobulinemia o anemia de Coombs positiva); miastenia grave; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; enfermedad de membranas basales antiglomerular; síndrome antifosfolípidos; neuritis alérgica; enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; penfigoide bulloso; pénfigo; autoinmune poliendocrinopatías; enfermedad de Reiter; síndrome de la persona rígida; enfermedad de Behçet; arteritis de células gigantes; nefritis compleja inmunitaria; nefropatía de IgA; polineuropatías de IgM; púrpura trombocitopénica inmunitaria (PTI) o trombocitopenia autoinmunitaria, etc.

El término **"unión"** se refiere a una asociación directa entre dos moléculas, debido, por ejemplo, a interacciones de enlaces covalentes, electrostáticos, hidrófobos y iónicos y/o de hidrógeno, que incluyen interacciones tales como puentes salinos y puentes acuosos. Las proteínas de unión incluyen por ejemplo anticuerpos y alternativas de

35 anticuerpos que incluyen agentes de unión, tal como se describe en la presente memoria.

El término **"deleción clonal"** se refiere a la deleción (por ejemplo, pérdida, o muerte) de linfocitos T autorreactivos. La deleción clonal puede conseguirse centralmente en el timo, o en la periferia, o en ambos.

- 40 A lo largo de la presente memoria descriptiva, salvo que por el contexto se requiera lo contrario, se entenderá que los términos **"comprender"**, **"comprende"** y **"que comprende"** implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos enunciados pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. Por **"que consiste en"** se entiende que incluye, y se limita a, lo que sigue en la frase "que consiste en". Así, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que no
- 45 puede estar presente ningún otro elemento. Por **"que consiste esencialmente en"** se entiende que incluye cualquier elemento enumerado después de la frase, y limitado a otros elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad o acción especificada en la descripción para los elementos enumerados. Así, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si influyen o no materialmente en la
- 50 actividad o acción de los elementos enumerados.

Por **"proceso continuo"** se entiende un proceso que puede definirse mediante una función constante que se aplica en el punto temporal de inicio del proceso y que termina en el punto final del proceso. Así, en el presente contexto un ejemplo típico de un proceso continuo es un procedimiento en el que un cierto tipo de fluido corporal, normalmente

55 sangre, se extrae a un flujo constante (es decir, un flujo sustancialmente ininterrumpido) de un paciente y se reintroduce también en el paciente con un flujo constante similar. Se entenderá que este procedimiento contrasta con cualquier otro procedimiento **"discontinuo"** donde el fluido corporal es extraído del paciente en un procedimiento independiente de una vez, opcionalmente almacenado y puesto en contacto con un adsorbente por lotes en otro momento y reintroducido en el paciente en otro momento más elegido básicamente independiente de

60 los dos primeros procedimientos.

El término "**libre de endotoxinas**" o "sustancialmente libre de endotoxinas" se refiere en general a composiciones, disolventes y/o vasos que contienen como máximo cantidades traza (por ejemplo, cantidades que no tienen efectos fisiológicos clínicamente adversos para un sujeto) de endotoxina, y preferentemente cantidades indetectables de endotoxina. Las endotoxinas son toxinas asociadas con ciertos microorganismos, tales como bacterias, normalmente bacterias gramnegativas, aunque las endotoxinas pueden encontrarse en bacterias grampositivas, tales como *Listeria monocytogenes*. Las endotoxinas más prevalentes son lipopolisacáridos (LPS) o lipooligosacáridos (LOS) encontrados en la membrana exterior de diversas bacterias gramnegativas, y que representan una característica patógena central en la capacidad de estas bacterias para provocar enfermedades. Pequeñas cantidades de endotoxinas en seres humanos pueden producir fiebre, un descenso de la presión arterial y la activación de inflamación y coagulación, entre otros efectos fisiológicos adversos.

Por tanto, en la producción farmacéutica, a menudo es conveniente eliminar la mayoría o la totalidad de las trazas de endotoxina de los productos farmacológicos y/o envases de fármacos, dado que incluso cantidades pequeñas pueden causar efectos adversos en los seres humanos. Para este fin puede usarse un horno de despirogenación, dado que normalmente se necesitan temperaturas superiores a 300°C para descomponer la mayoría de las endotoxinas. Por ejemplo, basándose en el material de envasado primario tal como jeringas o viales, la combinación de una temperatura vítrea de 250°C y un tiempo de retención de 30 minutos es suficiente a menudo para conseguir una reducción de 3 log en los niveles de endotoxina. Se contemplan otros procedimientos de eliminación endotoxinas, que incluyen, por ejemplo, procedimientos de cromatografía y filtrado, tal como se describe en la presente memoria y se conoce en la técnica. Se incluyen también procedimientos de producción de polipéptidos de HRS y su aislamiento de células eucariotas tales como células de mamíferos para reducir, si no eliminar, el riesgo de endotoxinas presentes en una composición tal como se describe en la presente memoria. Se prefieren procedimientos de producción de polipéptidos de HRS y aislamiento de las células sin suero.

Las endotoxinas pueden detectarse usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica. Por ejemplo, el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus*, que usa sangre del cangrejo herradura, es un ensayo muy sensible para detectar la presencia de endotoxinas. En esta prueba, niveles muy bajos de LPS pueden provocar una coagulación detectable del lisado de *Limulus* debido a una potente cascada enzimática que amplifica esta reacción. Las endotoxinas pueden cuantificarse también mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Para estar sustancialmente libres de endotoxinas, los niveles de las endotoxinas pueden ser inferiores a aproximadamente 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08, 0,09, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 UE/mg de proteínas. Normalmente, 1 ng de lipopolisacáridos (LPS) corresponde a aproximadamente 1-10 UE.

"**Epítipo**" se refiere a la parte de un antígeno u otra macromolécula capaz de formar una interacción de unión que interacciona con la región variable de un anticuerpo (o proteína semejante), alternativa de anticuerpo, agente de unión o receptor de linfocitos T. En el caso de anticuerpos, dichas interacciones de unión pueden manifestarse como un contacto intermolecular con uno o más residuos de aminoácidos de un CDR. La unión a antígeno puede implicar un CDR3 o un par de CDR3. Un epítipo puede ser una secuencia de péptidos lineales (por ejemplo, "continua") o puede estar compuesto por secuencias de aminoácidos no contiguos (por ejemplo, secuencias "conformacionales" o "discontinuas" que pueden formar por separado o de manera conjunta una forma reconocible). Una proteína de unión puede reconocer una o más secuencias de aminoácidos; por tanto un epítipo puede definir más de una secuencia de aminoácidos distinta. Los epítipos reconocidos por una proteína de unión pueden determinarse mediante cartografía de péptidos y técnicas de análisis de secuencias bien conocidas para el experto en la materia. Un "epítipo críptico" o un "sitio de unión críptico" es un epítipo o sitio de unión de una secuencia de proteínas que no está expuesto o está protegido sustancialmente del reconocimiento dentro de un polipéptido no modificado, o un complejo de proteínas o multimérico, pero es susceptible de ser reconocido por una proteína de unión al polipéptido proteolizado, o polipéptido disociado sin formación de complejo. Las secuencias de aminoácidos que no se exponen, o se exponen sólo parcialmente, en la estructura de polipéptidos multiméricos no modificados son epítipos potenciales. Si un epítipo no se expone, o se expone sólo parcialmente, entonces es probable que quede enterrado en el interior del polipéptido, o enmascarado en el complejo de polipéptidos por la unión de otras proteínas o factores. Los epítipos crípticos candidatos pueden identificarse, por ejemplo, examinando la estructura tridimensional de un polipéptido no modificado.

Las "**secuencias de control de expresión**" son secuencias reguladoras de ácidos nucleicos, o los aminoácidos correspondientes, tales como promotores, directores, potenciadores, intrones, motivos de reconocimiento para ARN, o proteínas de unión a ADN, señales de poliadenilación, terminadores, sitios de entrada de ribosomas internos (IRES), señales de secreción, señales de localización subcelular y similares, que tienen la capacidad de influir en la transcripción o traducción, o localización subcelular o celular de una secuencia codificante en una célula hospedadora. Se describen secuencias de control de expresión de ejemplo en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

El término **"fluidos corporales extracelulares"** se refiere a los fluidos extracelulares de organismos de mamíferos. Los ejemplos incluyen sangre, ascitis, plasma, linfa, líquido amniótico, orina, saliva y líquido cefalorraquídeo.

El término **"heterólogo"** se refiere a un ácido nucleico o una proteína que se han introducido en un organismo (tal como una planta, animal o célula procariota) o en una molécula de ácidos nucleicos (tal como un cromosoma, vector o construcción de ácidos nucleicos), que proceden de otra fuente, o que son de la misma fuente, pero están situados en un contexto diferente (es decir, no natural).

"Homología" se refiere al número porcentual de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservadoras. La homología puede determinarse usando programas de comparación de secuencias tales como GAP (Deveraux y col., 1984, *Nucleic Acids Research* 12, 387-395). De este modo secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en la presente memoria podrían compararse mediante la inserción de huecos en la alineación, estando dichos huecos determinados, por ejemplo, por el algoritmo de comparación usado por GAP.

El término **"concentración efectiva semimáxima"** o **"CE₅₀"** se refiere a la concentración de un agente (por ejemplo, polipéptido de HRS, u otro agente) tal como se describe en la presente memoria para la que induce una respuesta intermedia entre el valor basal y el máximo después de un tiempo de exposición especificado; la CE₅₀ de una curva de respuesta de dosis graduada representa por tanto la concentración de un compuesto para el que se observa el 50% de su efecto máximo. La CE₅₀ representa también la concentración en plasma requerida para obtener el 50% de un efecto máximo *in vivo*. De forma similar, la "CE₉₀" se refiere a la concentración de un agente o composición para el que se observa el 90% de su efecto máximo. La "CE₉₀" puede calcularse a partir de la "CE₅₀" y la pendiente de Hill, o puede determinarse a partir de los datos directamente, usando conocimientos rutinarios en la técnica. En algunas realizaciones de la presente descripción, la CE₅₀ de un agente de bloqueo de anticuerpos es inferior a aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 ó 500 nM. En algunas realizaciones de la presente descripción, una composición bioterapéutica tendrá un valor de CE₅₀ de aproximadamente 1 nM o menos.

Una **"composición inmunógena"** de la presente descripción, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier composición que desencadena una respuesta inmunitaria en un animal, tal como un mamífero. Una "respuesta inmunitaria" es la reacción del organismo a sustancias extrañas, sin implicar una consecuencia fisiológica o patológica de dicha reacción, es decir, sin conferir necesariamente inmunidad protectora en el animal. Una respuesta inmunitaria puede incluir uno o más de los siguientes aspectos: (a) una respuesta inmunitaria mediada por células, que implica la producción de linfocitos por el timo (linfocitos T) en respuesta a la exposición al antígeno; y/o (b) una respuesta inmunitaria humoral, que implica la producción de linfocitos (linfocitos B) en plasma en respuesta a la exposición a antígenos con posterior producción de anticuerpos.

Por **"aislado"** se entiende un material que está libre sustancialmente o esencialmente de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural. Por ejemplo, un "péptido aislado" o un "polipéptido aislado" y similares, tal como se usa en la presente memoria, incluye el aislamiento y/o purificación *in vitro* de una molécula de péptido o polipéptido de su entorno celular natural, y de la asociación con otros componentes de la célula; es decir, no está asociado significativamente con sustancias *in vivo*.

El término **"modulación"** incluye "aumento", "mejora" o "estimulación", así como "disminución" o "reducción", normalmente en una cantidad estadísticamente significativa o fisiológicamente significativa en comparación con un control. Una cantidad **"aumentada"**, **"estimulada"** o **"mejorada"** es normalmente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es de 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1.000 veces) (lo que incluye todos los números enteros y comas decimales intermedios y superiores a 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad sin composición (por ejemplo, en ausencia de cualquiera de los polipéptidos de HRS de la presente descripción) o una composición de control, muestra o sujeto de prueba. Una cantidad **"disminuida"** o **"reducida"** es normalmente una cantidad **"estadísticamente significativa"**, y puede incluir una disminución del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% en la cantidad sin composición (la ausencia de un agente o compuesto) o una composición de control, que incluye todos los números enteros intermedios.

Los términos **"ligado operativamente"**, **"unido operativamente"** o **"acoplado operativamente"** tal como se usa indistintamente en la presente memoria, se refieren a la colocación de dos o más secuencias de nucleótidos o elementos de secuencia de manera que les permite funcionar de la forma pretendida. En algunas realizaciones de la presente descripción, una molécula de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente descripción incluye uno o más elementos de ADN capaces de abrir la cromatina y/o de mantener cromatina en un estado abierto ligado

operativamente con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína recombinante. En otras realizaciones de la presente descripción, una molécula de ácidos nucleicos puede incluir además una o más secuencias de nucleótidos de ADN o ARN elegidas entre: (a) una secuencia de nucleótidos capaz de aumentar la traducción; (b) una secuencia de nucleótidos capaz de aumentar la secreción de la proteína recombinante fuera de una célula; (c) una secuencia de nucleótidos capaz de aumentar la estabilidad del ARNm, y (d) una secuencia de nucleótidos capaz de unirse a un factor de acción trans para modular la transcripción o traducción, donde dichas secuencias de nucleótidos están unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína recombinante. En general, pero no necesariamente, las secuencias de nucleótidos que están ligadas operativamente son contiguas y, cuando es necesario, están en un marco de lectura. Sin embargo, aunque un elemento de ADN ligado operativamente capaz de abrir la cromatina y/o mantener la cromatina en un estado abierto suele estar situado en sentido ascendente de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína recombinante, no es necesariamente contiguo a ella. La unión operativa de varias secuencias de nucleótidos se consigue mediante procedimientos recombinantes bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando metodología PCR, por ligado en sitios de restricción adecuados o por apareamiento. Pueden usarse conectores o adaptadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional si no existen sitios de restricción adecuados.

La actividad "**no canónica**" tal como se usa en la presente memoria, se refiere en general a i) una nueva actividad biológica de no aminoacilación que posee el polipéptido de HRS de la presente descripción que no posee en un grado significativo la proteína parental de longitud completa natural intacta, o ii) una actividad que posea la proteína parental de longitud completa natural intacta, donde el polipéptido de HRS muestra a) una actividad específica significativamente superior (por ejemplo, al menos el 20% superior) con respecto a la actividad no canónica en comparación con la proteína parental de longitud completa natural intacta, o b) muestra la actividad en un nuevo contexto; por ejemplo aislando la actividad de otras actividades que posee la proteína parental de longitud completa natural intacta, o en el contexto de un entorno extracelular, en comparación con el compartimento intracelular citoplásmico clásico.

Un "**promotor**" es una región reguladora de ADN capaz de unirse a ARN polimerasa en una célula y de iniciar la transcripción de una secuencia codificante en sentido descendente (dirección 3'). Tal como se usa en la presente memoria, la secuencia de promotores está unida en su extremo 3' por el sitio de inicio de transcripción y se extiende en sentido ascendente (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción en niveles detectables por encima del valor fundamental. Un sitio de inicio de transcripción (definido convenientemente por cartografía con nucleasa S1) puede encontrarse en una secuencia de promotores, así como dominios de unión a proteínas (secuencias de consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucariotas pueden contener a menudo, pero no siempre, cajas "TATA" y cajas "CAT". Los promotores procariotas contienen secuencias de Shine-Dalgarno además de las secuencias de consenso -10 y -35.

En la técnica se conoce bien un gran número de promotores, que incluyen promotores constitutivos, inducibles y represibles, a partir de una diversidad de fuentes diferentes. Las fuentes representativas incluyen por ejemplo, promotores de tipo vírico, de mamíferos, de insectos, de plantas, de levaduras y bacteriano), y los promotores adecuados a partir de estas fuentes son fáciles de obtener, o pueden prepararse sintéticamente, basándose en secuencias disponibles públicamente online o, por ejemplo, de repositorios tales como ATCC así como otras fuentes comerciales o individuales. Los promotores pueden ser unidireccionales (es decir, inician la transcripción en una dirección) o bidireccional (es decir, inician la transcripción en la dirección 3' o 5'). Los ejemplos no limitativos de promotores incluyen, por ejemplo, el sistema de expresión bacteriana T7, el sistema de expresión bacteriana pBAD (araA), el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor SV40, el promotor RSV. Los promotores inducibles incluyen el sistema Tet, (patentes de EE.UU. 5.464.758 y 5.814.618), el sistema inducible Ecdysone (No y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (1996) 93 (8): 3346-3351; el sistema T-RExTM (Invitrogen Carlsbad, CA), LacSwitch® (Stratagene, (San Diego, CA) y el sistema de recombinasa inducible por tamoxifeno Cre-ER^T (Indra y col. Nuc. Acid. Res. (1999) 27 (22): 4324-4327; Nuc. Acid. Res. (2000) 28 (23): e99; la patente de EE.UU. nº 7.112.715; y Kramer & Fussenegger, Methods Mol. Biol. (2005) 308: 123-144) o cualquier promotor conocido en la técnica adecuado para expresión en las células deseadas.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la "**pureza**" de cualquier agente suministrado (por ejemplo, polipéptido de HRS) en una composición puede definirse específicamente. Por ejemplo, algunas composiciones pueden comprender un agente que tiene al menos el 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100% de pureza, lo que incluye todos los decimales intermedios, tal como se mide, por ejemplo y sin que indique limitación, por cromatografía líquida a alta presión (HPLC), una forma bien conocida de cromatografía de columna usada frecuentemente en bioquímica y química analítica para separar, identificar y cuantificar compuestos.

Los términos "**polipéptido**" y "**proteína**" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos y a las variantes y análogos sintéticos del mismo. Así, estos términos se

aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son aminoácidos sintéticos de origen no natural, tales como un análogo químico de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como polímeros de aminoácidos de origen natural.

- 5 El término "**pronóstico**" se usa en la presente memoria para referirse a la predicción de la probabilidad de síntomas de la enfermedad, que incluye, por ejemplo, la recurrencia, el brote y la resistencia a fármacos, de una enfermedad. El término "predicción" se usa en la presente memoria para referirse a la probabilidad de que un sujeto o paciente responda favorable o desfavorablemente a un fármaco o conjunto de fármacos, por ejemplo, polipéptidos de HRS, u otros agentes. En una realización de la presente descripción, la predicción se refiere a la magnitud de estas
- 10 respuestas. En una realización de la presente descripción, la predicción se refiere a si y/o a la probabilidad de que un paciente sobreviva o mejore después del tratamiento, por ejemplo el tratamiento con un agente terapéutico en particular, y durante un cierto periodo de tiempo sin recurrencia de la enfermedad. Los procedimientos predictivos de la presente descripción pueden usarse clínicamente para tomar decisiones de tratamiento eligiendo las modalidades terapéuticas más apropiadas para cualquier paciente en particular. Los procedimientos predictivos de la presente
- 15 descripción son herramientas valiosas para predecir si es probable que un paciente responda favorablemente a un régimen de tratamiento, tal como un régimen terapéutico dado, que incluye por ejemplo, la administración de un agente o combinación terapéuticos, una intervención quirúrgica, un tratamiento con esteroides, etc., o si es probable la supervivencia a largo plazo del paciente, después de un régimen terapéutico.
- 20 Una "**subpoblación de pacientes**", o alternatively "**subpoblación de sujetos**" y las variaciones gramaticales de los mismos, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un subconjunto de pacientes caracterizado como poseedor de una o más características mensurables y/o identificables distintivas que distinguen al subconjunto de pacientes o sujetos de otros en la categoría extensa de enfermedad a la que pertenece. Dichas características incluyen subcategorías de enfermedad, género, estilo de vida, antecedentes sanitarios, órganos/tejidos afectados,
- 25 historia de tratamientos, etc. En una realización de la presente descripción, una subpoblación de pacientes o sujetos se caracteriza por los niveles de autoanticuerpos.

- La "**respuesta del paciente**" o alternatively "**respuesta del sujeto**" puede evaluarse mediante cualquier criterio de valoración que indique un beneficio para el paciente, lo que incluye, sin limitación, (1) la inhibición, en
- 30 cierta medida, del avance de la enfermedad, lo que incluye la ralentización y la interrupción por completo; (2) la reducción en el número de episodios y/o síntomas de la enfermedad; (3) la reducción en el tamaño de la lesión; (4) la inhibición (es decir, reducción, ralentización o interrupción por completo) del infiltrado de células de la enfermedad en órganos y/o tejidos periféricos adyacentes; (5) la inhibición (es decir, reducción, ralentización o interrupción por completo) de la difusión de la enfermedad; (6) la disminución de la respuesta autoinmunitaria, que puede, aunque no
- 35 necesariamente, producir la regresión o ablación de la lesión de la enfermedad; (7) el alivio, en cierta medida, de uno o más síntomas asociados con el trastorno; (8) el aumento en la duración de la presentación sin enfermedad después del tratamiento; y/o (9) la disminución de la mortalidad en un instante de tiempo dado después del tratamiento.
- 40 El término "**específico**" es aplicable a una situación en la que un miembro de un par de unión específico no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de sus contrapartes de unión específicas. El término es aplicable también cuando por ejemplo, un dominio de unión a antígeno es específico de un epítipo en particular que es llevado por una serie de antígenos, en cuyo caso el miembro de unión específica que lleva el dominio de unión a antígeno podrá unirse a los diversos antígenos que llevan el epítipo.

- 45 Por "**estadísticamente significativo**" se entiende que era improbable que el resultado se produjera por casualidad. La significación estadística puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Las medidas de significación usadas comúnmente incluyen el valor p, que es la frecuencia o probabilidad con que sucedería el episodio observado, si la hipótesis nula fuera cierta. Si el valor p obtenido es inferior al nivel de
- 50 significación, entonces la hipótesis nula se rechaza. En casos sencillos, el nivel de significación se define en un valor p de 0,05 o menos.

- El término "**solubilidad**" se refiere a la propiedad de un agente de bloqueo de anticuerpos proporcionado en la presente memoria de disolverse en un disolvente líquido y formar una solución homogénea. La solubilidad se
- 55 expresa normalmente en forma de concentración, ya sea por masa de soluto por unidad de volumen de disolvente (g de soluto por kg de disolvente, g por dL (100 mL), mg/mL, etc.), molaridad, molaridad, fracción molar u otras descripciones de concentración similares. La cantidad de equilibrio máxima de soluto que puede disolverse por cantidad de disolvente es la solubilidad de ese soluto en ese disolvente en condiciones específicas, que incluyen temperatura, presión, pH y la naturaleza del disolvente. En algunas realizaciones de la presente descripción, la
- 60 solubilidad se mide a pH fisiológico, u otro pH, por ejemplo, a pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0 o pH 7,4. En algunas realizaciones de la presente descripción, la solubilidad se mide en agua o un tampón fisiológico tal como PBS o NaCl

(con o sin NaP). En realizaciones específicas de la presente descripción, la solubilidad se mide a un pH relativamente inferior pH (por ejemplo, pH 6,0) y sal relativamente superior (por ejemplo, NaCl 500 mM y NaP 10 mM). En algunas realizaciones de la presente descripción, la solubilidad se mide en un fluido biológico (disolvente) tal como sangre o suero. En algunas realizaciones de la presente descripción, la temperatura puede ser aproximadamente la temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25°C) o desde aproximadamente la temperatura corporal (37°C). En algunas realizaciones de la presente descripción, un polipéptido de HRS tiene una solubilidad de al menos aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 mg/ml a temperatura ambiente o a 37°C.

10

Un **"sujeto"**, tal como se usa en la presente memoria, incluye cualquier animal que muestra un síntoma, o está en riesgo de mostrar un síntoma, que puede ser tratado o diagnosticado con un polipéptido de HRS, o un agente de bloqueo de anticuerpos descrito en la presente memoria. Los sujetos (pacientes) adecuados incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o perro). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, pacientes humanos.

15

"Sustancialmente" o **"esencialmente"** significa casi total o completamente, por ejemplo, el 95% o más de una cierta cantidad dada.

20 **"Respuesta terapéutica"** se refiere una mejoría de los síntomas (sostenida o no) basada en la administración de la respuesta terapéutica (con tolerancia inducida o no).

El término **"tolerancia"** se refiere a una capacidad de respuesta reducida específica y sostenida (por ejemplo, un mes o más) del sistema inmunitario a un antígeno (por ejemplo, autoantígeno) en el ajuste de un sistema inmunitario por lo demás sustancialmente normal. La tolerancia es distinta de la inmunosupresión generalizada en el sentido de que se reduce la totalidad, o la totalidad de una clase tal como las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos B de las respuestas inmunitarias. **"Tolerización"** se refiere a un proceso que conduce al estado de tolerancia.

25

Tal como se usa en la presente memoria, los términos **"cantidad terapéuticamente efectiva"**, **"dosis terapéutica"**, **"cantidad profilácticamente efectiva"** o **"cantidad efectiva en términos diagnósticos"** es la cantidad del fármaco, por ejemplo, polipéptido de HRS o anticuerpo, necesaria para desencadenar la respuesta biológica deseada después de la administración. De forma similar el término "terapia con polipéptido de HRS" se refiere a una terapia que mantiene la concentración media en estado estacionario de un polipéptido de HRS en el plasma del paciente por encima del nivel terapéutico efectivo mínimo.

30

"Tratamiento" o **"tratar"**, tal como se usa en la presente memoria, incluye cualquier efecto deseable en los síntomas o la patología de una enfermedad o afección, y puede incluir incluso cambios o mejorías mínimos en uno o más marcadores mensurables de la enfermedad o afección que se trata. "Tratamiento" o "tratar" no indica necesariamente la erradicación o curación completa de la enfermedad o afección, o de los síntomas asociados de las mismas. El sujeto que recibe este tratamiento es cualquier sujeto necesitado del mismo. Los marcadores de ejemplo de la mejoría clínica serán evidentes para los expertos en la materia.

40

El término **"vacuna"**, tal como se usa en la presente memoria, se refiere en sentido extenso a cualquier composición que puede administrarse a un animal para desencadenar una respuesta inmunitaria protectora a la vacuna o el antígeno coadministrado. Los términos "proteger", "respuesta inmunitaria protectora" o "inmunidad protectora", tal como se usan en la presente memoria describen el desarrollo de anticuerpos o sistemas celulares que reconocen específicamente el antígeno de la vacuna.

45

Los términos **"vector"**, **"vector de clonación"** y **"vector de expresión"** se refieren al vehículo por el que una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) puede introducirse en una célula hospedadora de manera que transforme al hospedador y promueva la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los vectores pueden incluir plásmidos, fagos, virus, etc. y se exponen en mayor detalle más adelante.

50

Salvo que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la materia al que pertenece la presente descripción.

55

Visión general

La presente descripción se refiere al desarrollo de composiciones terapéuticas, diagnósticos y procedimientos mejorados para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, y en algunos aspectos de la presente descripción al tratamiento de miopatías inflamatorias, y enfermedades y trastornos relacionados, que incluye

60

enfermedades pulmonares asociadas con el desarrollo de autoanticuerpos a la histidil-tRNA sintetasa, proteínas relacionadas y otros anticuerpos.

La presente descripción incluye también el desarrollo de composiciones terapéuticas, diagnósticos y procedimientos mejorados para tratar enfermedades que tienen un componente inflamatorio secundario, que por otra parte agrava, perpetúa o impulsa el avance de la enfermedad, y que puede estar causado por una lesión o defecto genético no relacionado.

En algunos aspectos de la presente descripción, dichos tratamientos proporcionan una eficacia mejorada con respecto a los procedimientos de tratamiento existentes, y muestran un perfil de efectos secundarios mejorados significativamente.

"Inflamación" se refiere en general a la respuesta biológica de los tejidos a estímulos perjudiciales, tales como patógenos, células dañadas (por ejemplo, heridas) e irritantes. El término "respuesta inflamatoria" se refiere a los mecanismos específicos por los que se consigue y se regula la inflamación, lo que incluye, simplemente a modo de ilustración, activación o migración de células inmunitarias, producción de citocinas, vasodilatación, que incluye liberación de cinina, fibrinólisis y coagulación, entre otros tal como se describe en la presente memoria y se conoce en la técnica.

Los signos clínicos de inflamación crónica dependen de la duración de la dolencia, las lesiones inflamatorias, la causa y la zona anatómica afectada (véase, por ejemplo, Kumar y col., Robbins Basic Pathology-8ª ed., 2009 Elsevier, Londres; Miller, LM, Pathology Lecture Notes, Atlantic Veterinary College, Charlottetown, PEI, Canadá). La inflamación crónica está asociada con diversos estados patológicos o enfermedades, que incluyen, por ejemplo, autoinmunidad, alergias, enfermedad de Alzheimer, anemia, estenosis de la válvula aórtica, artritis tal como artritis reumatoide y artrosis, cáncer, insuficiencia cardíaca congestiva, fibromialgia, fibrosis, ataque al corazón, insuficiencia renal, lupus, pancreatitis, accidente cerebrovascular, complicaciones quirúrgicas, enfermedad inflamatoria pulmonar, enfermedad inflamatoria intestinal, aterosclerosis, trastornos neurológicos, diabetes, trastornos metabólicos, obesidad, y psoriasis, entre otros descritos en la presente memoria y conocidos en la técnica. Por consiguiente, los polipéptidos de HRS pueden usarse para tratar o abordar la inflamación crónica, modular cualquiera de entre una o más de las respuestas inflamatorias crónicas individuales, o tratar una cualquiera o más de las enfermedades o afecciones asociadas con inflamación aguda o crónica.

Los criterios para evaluar los signos y síntomas de las afecciones inflamatorias y otras, que se incluyen con fines de establecer el diagnóstico diferencial y también de monitorizar tratamientos tales como la determinación de si se ha administrado una dosis terapéuticamente efectiva en el curso del tratamiento, por ejemplo, determinando la mejoría de acuerdo con criterios clínicos aceptados, serán evidente para los expertos en la materia y se ilustran mediante las enseñanzas, por ejemplo, de Berkow y col., ed., The Merck Manual, 16ª edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Goodman y col., ed., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (2001); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3ª edición, ADIS Press, Ltd., Williams y Wilkins, Baltimore, MD. (1987); Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston, (1985); Osolci y col., ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990); Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, Appleton and Lange, Norwalk, CT (1992).

Por consiguiente, algunos aspectos de la presente descripción incluyen procedimientos para reducir la inflamación de los tejidos, que comprenden la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre a) un polipéptido de HRS, b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o c) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo. En algunas realizaciones de la presente descripción, el tejido se selecciona de entre músculo, pulmón y piel.

Algunos aspectos de la presente descripción incluyen procedimientos para reducir la inflamación muscular o pulmonar asociada con una enfermedad autoinmunitaria que comprende la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre a) un polipéptido de HRS, b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o c) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo.

Se incluyen también procedimientos de tratamiento de una enfermedad asociada con un autoanticuerpo que comprende la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición terapéutica que comprende uno o más de entre a) un polipéptido de HRS, b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, c) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido

de HRS heterólogo, o d) un anticuerpo o proteína de unión específica al autoanticuerpo; donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo reconocido específicamente por el autoanticuerpo.

Algunos aspectos de la presente descripción incluyen procedimientos de inducir tolerancia a un antígeno de histidil-tRNA sintetasa (HisRS), comprendiendo dicho procedimiento la administración a un sujeto de una composición que comprende uno o más de entre a) un polipéptido de HRS, b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o c) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo; donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo reconocido específicamente por el autoanticuerpo, y donde la administración de la composición provoca tolerización al autoantígeno.

Algunos aspectos de la presente descripción incluyen procedimientos para reducir o eliminar un conjunto o subconjunto de linfocitos T implicados en una respuesta autoinmunitaria a un autoantígeno de histidil-tRNA sintetasa (HisRS), comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto de una composición que comprende uno o más de entre a) un polipéptido de HRS, b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o c) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo; donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo reconocido específicamente por el autoanticuerpo, y donde la administración de la composición provoca delección clonal de linfocitos T autorreactivos.

Se incluyen también procedimientos para inducción de anergia en linfocitos T implicados en una respuesta autoinmunitaria a un autoantígeno de histidil-tRNA sintetasa (HisRS), comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto de una composición que comprende uno o más de entre a) un polipéptido de HRS, b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o c) una célula hospedadora recombinante, donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo; donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo reconocido específicamente por el autoanticuerpo, y donde la administración de la composición provoca inactivación funcional de los linfocitos T implicados en la respuesta autoinmunitaria. Algunas de estas realizaciones y otras relacionadas de la presente descripción incluyen procedimientos para reducir la presencia o los niveles de "linfocitos T activados por autoantígenos" de histidil-tRNA sintetasa y/o "linfocitos B activados por autoantígenos" de histidil-tRNA sintetasa.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el sujeto que tiene una enfermedad asociada con un autoanticuerpo tiene una predisposición genética a enfermedades o trastornos autoinmunitarios. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente descripción, el sujeto tiene un alotipo de MHC de clase II tal como HLA DR2, HLA DR3, HLA DR4, mutaciones en la proteína tirosina fosfatasa, no receptor tipo 22 (PTPN22), y desregulación de vías tales como los receptores de reconocimiento de patógenos del sistema inmunitario innato y la familia de supergenes TNF (véase, por ejemplo, Rai y Wakeland, Semin. Immunology. 23:67-83, 2011), cada uno de los cuales se ha correlacionado con ciertos trastornos autoinmunitarios.

Algunos aspectos de la presente descripción incluyen terapias de sustitución para tratar una enfermedad asociada con una insuficiencia de histidil-tRNA sintetasa, que comprende la administración a un sujeto necesitado de las mismas de una composición terapéutica que comprende uno o más de entre a) un polipéptido de HRS, b) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, c) una célula hospedadora recombinante, donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo, o d) un anticuerpo o proteína de unión específica al autoanticuerpo; donde el polipéptido de HRS compensa funcionalmente la insuficiencia a la histidil-tRNA sintetasa.

En algunas terapias de sustitución, la insuficiencia a la histidil-tRNA sintetasa es originada por la presencia de anticuerpos anti-Jo-1. En algunos aspectos de la presente descripción de esta terapia de sustitución, la insuficiencia a la histidil-tRNA sintetasa es originada por mutaciones en una histidil-tRNA sintetasa endógena que modula la actividad, la expresión o la distribución celular de la histidil-tRNA sintetasa endógena. En algunos aspectos de la presente descripción la insuficiencia a la histidil-tRNA sintetasa se asocia con el síndrome de Perrault o el síndrome de Usher. En algunos aspectos de la presente descripción, la insuficiencia a la histidil-tRNA sintetasa se asocia con la producción local insuficiente de histidil-tRNA sintetasa en un tejido o en el lugar de la lesión o inflamación. En algunos aspectos de la presente descripción, la insuficiencia a la histidil-tRNA sintetasa se asocia con una o más de entre rabdomiólisis, caquexia y/o lesión muscular.

El término "tolerancia", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la reducción sostenida o la ausencia de una respuesta inmunitaria a un antígeno específico en un mamífero, en particular un ser humano. La tolerancia es distinta de la inmunosupresión generalizada, en el sentido de que todas o todas de entre una clase específica de células inmunitarias, tales como las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos B, de una respuesta inmunitaria

están disminuidas, o eliminadas. El desarrollo de tolerancia puede vigilarse rutinariamente por la ausencia, o una disminución, en la concentración entre anticuerpos y polipéptidos de HRS en el suero del sujeto hospedador después de la administración, en dosis únicas o sucesivas del polipéptido de HRS de tratamiento. El desarrollo de tolerancia será suficiente normalmente para reducir los síntomas de la enfermedad autoinmunitaria en el paciente, por ejemplo un paciente puede mejorar suficientemente de manera que mantenga actividades normales en ausencia, o en presencia de cantidades reducidas, de inmunosupresores generales, por ejemplo, corticoesteroides.

En cualquiera de estos procedimientos o composiciones, la tolerancia será normalmente sostenida, lo que significa que tendrá una duración de aproximadamente un mes, aproximadamente dos meses, aproximadamente tres meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses o desde aproximadamente 6 meses o más. La tolerancia puede producir anergia de linfocitos B o anergia de linfocitos T selectiva o ambas.

En cualquiera de estos procedimientos, tratamientos y composiciones terapéuticas, el término "una enfermedad asociada con autoanticuerpos específicos para histidil-tRNA sintetasa" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno en el que se detectan anticuerpos para la histidil-tRNA sintetasa, o son detectables, con independencia de si se detectan también otros autoanticuerpos, o se piensa que desempeñan un papel en el avance o causa de la enfermedad. Los procedimientos para detectar anticuerpos en muestras de pacientes pueden realizarse mediante cualquier procedimiento estándar que incluye por ejemplo, RIA, ELISA, inmunoprecipitación, tinción de tejidos o células (incluidas células transfectadas), micromatrices de antígenos, análisis por espectroscopia de masas, ensayos de neutralización específica o uno de entre otros distintos procedimientos conocidos en la técnica para identificar la especificidad a antígenos deseada. En algunos aspectos de la presente descripción, la especificidad de anticuerpos puede caracterizarse además por la determinación de la capacidad de los anticuerpos para unirse selectivamente a diferentes variantes de splicing y formas truncadas o proteolíticas de histidil-tRNA sintetasa. Un anticuerpo humano relativamente bien conocido para histidil-tRNA sintetasa incluye por ejemplo los anticuerpos a Jo-1.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende un epítipo de la histidil-tRNA sintetasa que experimenta una reacción cruzada específicamente con un autoanticuerpo asociado a una enfermedad para histidil-tRNA sintetasa. En algunas realizaciones de la presente descripción de cualquiera de los procedimientos y composiciones descritos, el polipéptido de HRS comprende un epítipo de la histidil-tRNA sintetasa que experimenta una reacción cruzada específicamente con un linfocito T autorreactivo asociado a una enfermedad para histidil-tRNA sintetasa. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende un epítipo que experimenta una reacción cruzada específicamente con un autoanticuerpo asociado a una enfermedad para otra tRNA sintetasa, o con un autoanticuerpo no de tRNA sintetasa.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende un epítipo inmunodominante que es reconocido específicamente por la mayoría de los anticuerpos de los sueros de un paciente con una enfermedad asociada con autoanticuerpos para histidil-tRNA sintetasa. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende un epítipo inmunodominante que es reconocido específicamente por la mayoría de los linfocitos T autorreactivos de los sueros de un paciente con una enfermedad asociada con autoanticuerpos para histidil-tRNA sintetasa.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el epítipo está comprendido en el dominio WHEP del polipéptido de HRS (aproximadamente los aminoácidos 1-43 de la SEQ ID NO: 1); el dominio de aminoacilación (aproximadamente los aminoácidos 54-398 de la SEQ ID NO: 1); o el dominio de unión a anticodones (aproximadamente los aminoácidos 406-501 de la SEQ ID NO: 1) o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS no comprende un epítipo que experimenta una reacción cruzada específicamente con un autoanticuerpo asociado a una enfermedad para histidil-tRNA sintetasa. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS no compite significativamente por autoanticuerpos asociados a la enfermedad que se unen a histidil-tRNA sintetasa en un ensayo ELISA competitivo hasta una concentración de aproximadamente 1×10^{-7} M. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS no compite significativamente por autoanticuerpos asociados a la enfermedad que se unen a histidil-tRNA sintetasa en un ensayo ELISA competitivo hasta una concentración de aproximadamente 5×10^{-7} M. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS no compite significativamente por autoanticuerpos asociados a la enfermedad que se unen a histidil-tRNA sintetasa en un ensayo ELISA competitivo hasta una concentración de aproximadamente 1×10^{-6} M.

Por consiguiente en algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una menor afinidad por un autoanticuerpo asociado a una enfermedad que la histidil-tRNA sintetasa de tipo no mutado (SEQ ID NO: 1) según se mide en un ensayo ELISA competitivo. En algunas realizaciones de la presente descripción, el

polipéptido de HRS tiene una afinidad aparente por el autoanticuerpo asociado a la enfermedad que es al menos aproximadamente 10 veces menor, o al menos aproximadamente 20 veces menor, o al menos aproximadamente 50 veces menor, o al menos aproximadamente 100 veces menor que la afinidad del autoanticuerpo asociado a la enfermedad para la forma humana no mutada (SEQ ID NO: 1). En algunos aspectos de la presente descripción, el autoanticuerpo para histidil-tRNA sintetasa se dirige al antígeno Jo-1.

Los ejemplos de enfermedades asociadas con autoanticuerpos específicos para histidil-tRNA sintetasa (así como enfermedades asociadas con una insuficiencia de histidil-tRNA sintetasa) incluyen sin limitación enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, y miopatías inflamatorias, lo que incluye miopatías inflamatorias, polimiositis, miopatías inducidas por estatinas, dermatomiositis, enfermedad pulmonar intersticial (y otras afecciones fibróticas pulmonares) y trastornos relacionados, tales como solapamiento de polimiositis-esclerodermia y miositis de cuerpos de inclusión (MCI) y afecciones tales como las encontradas en los síndromes anti-sintetasa, que incluyen por ejemplo, enfermedad pulmonar intersticial, artritis, dismotilidad esofágica, enfermedades cardiovasculares y otras manifestaciones vasculares tales como fenómeno de Raynaud; otros ejemplos de enfermedades asociadas con una insuficiencia de histidil-tRNA sintetasa incluyen trastornos genéticos que producen una insuficiencia de histidil-tRNA sintetasa activa que incluye el síndrome de Usher y el síndrome de Perrault. Los ejemplos adicionales de enfermedades de insuficiencia a la histidil-tRNA sintetasa incluyen enfermedades y trastornos inflamatorios asociados con producción local insuficiente de histidil-tRNA sintetasa en un tejido, o en el sitio de la lesión o inflamación. En algunos aspectos de la presente descripción la insuficiencia a la histidil-tRNA sintetasa se asocia con una o más de entre rabdomiólisis, caquexia y/o lesión muscular.

En algunas realizaciones de la presente descripción, al bloquear la unión, acción, o producción de anticuerpos anti-histidil-tRNA sintetasa, las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria tienen utilidad para tratar una amplia diversidad de enfermedades y trastornos autoinmunitarios inflamatorios asociados con anticuerpos anti-histidil-tRNA sintetasa, otros autoanticuerpos, así como enfermedades asociadas con insuficiencia a la histidil-tRNA sintetasa.

Además la administración de polipéptidos de HRS de la presente descripción, al restaurar la concentración de histidil-tRNA sintetasa (en ausencia de anticuerpos anti-histidil-tRNA sintetasa) puede modular respuestas inflamatorias locales que son efectivas tanto en el tratamiento de una amplia diversidad de enfermedades y trastornos inflamatorios, así como enfermedades en que la inflamación es secundaria a la enfermedad primaria, como sucede, por ejemplo, con las distrofias musculares.

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de tratamiento de una miositis que comprenden la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre i) un polipéptido de HRS, ii) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o iii) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo. En algunas realizaciones de la presente descripción, la miositis es polimiositis. En algunas realizaciones de la presente descripción, la miositis es dermatomiositis.

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de tratamiento de miositis de cuerpos de inclusión (MCI) que comprenden la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre i) un polipéptido de HRS, ii) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o iii) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo.

Se incluyen también procedimientos de tratamiento de miositis juvenil que comprenden la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre i) un polipéptido de HRS, ii) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o iii) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo.

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de tratamiento de una miopatía inducida por estatinas que comprenden la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre i) un polipéptido de HRS, ii) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o iii) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo. En algunas realizaciones de la presente descripción, la estatina es cerivastatina.

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de tratamiento de una enfermedad pulmonar intersticial (EPI) que comprenden la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre i) un polipéptido de HRS, ii) un ácido nucleico recombinante que codifica un

polipéptido de HRS heterólogo, o iii) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo.

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de tratamiento de síndrome de Usher que comprenden la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre i) un polipéptido de HRS, ii) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o iii) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo. Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de tratamiento de síndrome de Usher de tipo 1. Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de tratamiento de síndrome de Usher de tipo 2. Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de tratamiento de síndrome de Usher de tipo 3.

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de tratamiento de síndrome de Perrault (SP) que comprenden la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre i) un polipéptido de HRS, ii) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o iii) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo.

Se incluyen también procedimientos de tratamiento de una distrofia muscular que comprenden la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre i) un polipéptido de HRS, ii) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o iii) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo. En algunos aspectos de la presente descripción, la distrofia muscular se selecciona de entre distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular de cinturas y miembros, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia miotónica, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular distal y distrofia muscular congénita.

Se incluyen también procedimientos de tratamiento de caquexia que comprenden la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre i) un polipéptido de HRS, ii) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o iii) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo.

Se incluyen también procedimientos de tratamiento de rabdomiólisis que comprenden la administración a un sujeto necesitado del mismo de una composición que comprende uno o más de entre i) un polipéptido de HRS, ii) un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS heterólogo, o iii) una célula hospedadora recombinante; donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo.

A continuación se describen en mayor detalle algunos trastornos inflamatorios o autoinmunitarios de ejemplos.

La **polimiositis** afecta a los músculos esqueléticos (implicados en la realización de movimientos) en los dos lados del cuerpo. Rara vez se observa en personas de menos de 18 años; la mayoría de los casos se presentan en personas de entre 31 y 60 años. Además de los síntomas enumerados anteriormente, la debilidad muscular progresiva provoca dificultad de deglutir, hablar, levantarse desde una posición sentada, subir escaleras, levantar objetos o alcanzar objetos por encima de la cabeza. Las personas con polimiositis también pueden experimentar artritis, disnea y arritmias cardíacas.

La **dermatomiositis** se caracteriza por un exantema en la piel que precede o acompaña a una debilidad muscular progresiva. El exantema aparece en manchas dispersas, con decoloraciones de color morado o rojo, y se desarrolla de forma característica en los párpados y en los músculos usados para extender y enderezar las articulaciones, que incluyen los nudillos, los codos, las rodillas y los dedos de los pies. También pueden aparecer exantemas rojos en la cara, el cuello, los hombros, el tórax superior, la espalda y otros lugares, y puede existir tumefacción en las zonas afectadas. El exantema aparece a veces sin afectación muscular evidente. Los adultos con dermatomiositis pueden experimentar pérdida de peso o fiebre baja, tener inflamación pulmonar y ser sensibles a la luz. La dermatomiositis adulta, a diferencia de la polimiositis, puede acompañar a tumores de la mama, el pulmón, los genitales femeninos o el intestino. Los niños y adultos con dermatomiositis pueden desarrollar depósitos de calcio, que aparecen a modo de bultos duros bajo la piel o en el músculo (denominados calcinosis). Muy a menudo la calcinosis aparece entre 1 y 3 años después del inicio de la enfermedad pero puede producirse muchos años más tarde. Estos depósitos se observan más a menudo en la dermatomiositis infantil que en la dermatomiositis que empieza en la edad adulta. La dermatomiositis puede asociarse con enfermedades autoinmunitarias o vasculares del colágeno.

En algunos casos de polimiositis y dermatomiositis, a medida que progresa la enfermedad pueden verse afectados

los músculos distales (lejos del tronco del cuerpo, tales como los de los antebrazos o los que rodean a los tobillos y las muñecas). La polimiositis y la dermatomiositis pueden estar asociadas con enfermedades autoinmunitarias o vasculares del colágeno. La polimiositis puede estar asociada también con trastornos infecciosos.

- 5 La **miositis de cuerpos de inclusión (MCI)** se caracteriza por agotamiento y debilidad muscular progresivos. El inicio de la debilidad muscular suele ser gradual (en el curso de meses o años) y afecta a los músculos proximales y distales. La debilidad muscular puede afectar sólo a un lado del cuerpo. A veces se observan pequeños orificios llamados vacuolas en las células de las fibras musculares afectadas. Las caídas y los tropiezos suelen ser los primeros síntomas que se observan de MCI. En algunas personas el trastorno comienza con debilidad en las
- 10 muñecas y los dedos de la mano que provoca dificultades para hacer el movimiento de pinza, pulsar botones y agarrar objetos. Puede existir debilidad de los músculos de las muñecas y los dedos y atrofia (adelgazamiento o pérdida de masa muscular) de los músculos de los antebrazos y los cuádriceps de las piernas. La dificultad para la deglución aparece aproximadamente en la mitad de los casos de MCI. Los síntomas de la enfermedad empiezan normalmente después de los 50 años de edad, aunque la enfermedad puede aparecer antes. A diferencia de la
- 15 polimiositis y la dermatomiositis, la MCI tiene lugar más frecuentemente en hombres que en mujeres.

- La **miositis juvenil** presenta algunas semejanzas con la dermatomiositis y la polimiositis en adultos. Normalmente afecta a niños de entre 2 y 15 años de edad, con síntomas que incluyen debilidad muscular proximal e inflamación, edema (una acumulación anómala de líquidos en los tejidos corporales que provoca tumefacción), dolor muscular,
- 20 fatiga, exantemas en la piel, dolor abdominal, fiebre y contracturas (acortamiento crónico de los músculos o los tendones en torno a las articulaciones, causados por inflamación en los tendones de los músculos, que impide el movimiento libre de las articulaciones). Los niños con miositis juvenil también pueden tener dificultades para deglutir y respirar, y puede verse afectado el corazón. Aproximadamente del 20 al 30% de los niños con dermatomiositis juvenil desarrollan calcinosis. Los niños afectados pueden no mostrar niveles superiores a lo normal de la enzima de
- 25 los músculos creatina cinasa en sangre pero tienen niveles superiores a lo normal de otras enzimas de los músculos.

- Las **miopatías inducidas por estatinas** se asocian con el uso a largo plazo de estatinas que actúan por medio de la inhibición de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR). En general bien toleradas, estas medicaciones se han descrito como inductoras de miotoxicidad. Más recientemente, se han conocido informes de
- 30 pacientes en los que las miopatías inducidas por estatinas persisten incluso después de interrumpir los fármacos, por lo que se ha propuesto que podrían tener una causa autoinmunitaria. Los beneficios de las estatinas son indiscutibles en cuanto a la reducción del riesgo de enfermedades cardíacas coronarias y de la progresión de la aterosclerosis coronaria. No obstante, las complicaciones asociadas pueden poner en riesgo la vida. Se estima que en la actualidad en los Estados Unidos más de 38 millones de personas toman estatinas y hasta el 7% (>2,6
- 35 millones) de ellas desarrollarán, según las predicciones, síntomas musculares y hasta el 0,5% (>190.000) de las mismas desarrollarán posiblemente miopatías que ponen en riesgo la vida.

- Todas las estatinas pueden ocasionar problemas musculares y el riesgo aumenta con el incremento de su lipofilia, con su potencia para reducir el colesterol y con la dosis. En particular la cerivastatina se ha relacionado con un
- 40 riesgo más elevado y se ha retirado del mercado estadounidense. De las restantes estatinas, la atorvastatina y la simvastatina tienen las tasas de miotoxicidad más elevadas. Otros agentes de reducción de lípidos no pertenecientes a las estatinas tales como la niacina y los fibratos también comportan riesgos de problemas musculares, en particular cuando se combinan con estatinas. Aunque no es posible predecir qué pacientes tendrán problemas musculares inducidos por las estatinas, los problemas musculares citados pueden constituir un factor de
- 45 riesgo y deben tenerse en cuenta al iniciar el tratamiento con estatinas. Resulta pertinente estudiar los antecedentes familiares si un paciente pudiera ser transmisor de una miopatía genética dado que podría ponerse de manifiesto ante el estrés añadido del tratamiento con estatinas. Otros factores de riesgo pueden incluir tener más 80 años, un bajo peso corporal, sexo femenino, hipotiroidismo, ciertos defectos de genéticos y ascendencia asiática, así como el uso concomitante de determinados medicamentos, que incluyen bloqueadores del canal del calcio, antibióticos
- 50 macrólidos, omeprazol, amiodarona, antifúngicos de azol, antagonistas receptores de histamina H₂, nefazodona, ciclosporina, inhibidores de la proteasa VIH, warfarina y zumo de pomelo.

- El síntoma muscular más común causado por las estatinas es dolor muscular o mialgia y se produce en aproximadamente el 7% de los consumidores de estatinas. La mialgia puede ser desde leve a grave y a menudo
- 55 empeora con la actividad muscular. Si el síntoma es tolerable y la indicación para el tratamiento con estatinas fuerte, por ejemplo, en un paciente con hipercolesterolemia y un infarto de miocardio reciente, puede ser apropiado un tratamiento continuado con estatinas.

- Los niveles basales de creatina cinasa (CK) no se recomiendan uniformemente antes del inicio del tratamiento con estatinas por las organizaciones que orientan el tratamiento con estatinas, pero los niveles de CK pueden
- 60 proporcionar información muy útil si más adelante se desarrollan síntomas musculares. También puede producirse

debilidad muscular, y a menudo produce fatiga y se combina con dolor y valores elevados de CK. Al igual que la mayoría de las miopatías, la debilidad es más acusada proximalmente. Se han descrito también episodios raros de rabdomiólisis con tratamiento con estatinas; son bastante menos frecuentes, pero pueden ser letales. Los cambios que pueden observarse en la histología muscular que son más característicos de una miopatía por estatinas son

- 5 fibras negativas en citocromo oxidasa, aumento del contenido de lípidos y fibras rojas degradadas. La miopatía necrosante autoinmunitaria es una forma rara de miopatía por estatinas. En estos pacientes, la interrupción del fármaco de estatinas no se traduce en una recuperación ni siquiera después de transcurrir varios meses desde que se interrumpió el fármaco. Los pacientes tienen una debilidad predominantemente proximal, a menudo indolora.
- 10 El diagnóstico se basa en la historia médica del sujeto, los resultados de una exploración física y las pruebas de fuerza muscular, así como análisis de sangre que muestran niveles elevados de diversas enzimas musculares y autoanticuerpos. Entre las herramientas diagnósticas se incluyen electromiografía para registrar la actividad eléctrica que controla los músculos durante la contracción y en reposo, ecografía para buscar para inflamación muscular y resonancia magnética para poner de relieve anomalías en el músculo y evaluar enfermedades musculares. Puede
- 15 examinarse al microscopio una biopsia del músculo en busca de signos de inflamación crónica, muerte de las fibras musculares, deformidades vasculares o los cambios específicos para el diagnóstico de MCI. Una biopsia de la piel puede mostrar cambios en la capa cutánea de pacientes con dermatomiositis.

- La **enfermedad pulmonar intersticial (EPI)** es una categoría extensa de enfermedades pulmonares que incluye
- 20 más de 130 trastornos caracterizados por lesiones cicatriciales (es decir, "fibrosis") y/o inflamación de los pulmones. La EPI supone el 15% de los casos observados por los neumólogos. La enfermedad pulmonar intersticial (EPI) puede desarrollarse a partir de diversas fuentes, desde otras enfermedades a factores ambientales. Algunas de las causas conocidas de EPI son: enfermedad autoinmunitaria del tejido conjuntivo, que incluye por ejemplo, esclerodermia/esclerosis sistémica progresiva, lupus (lupus eritematoso sistémico), artritis reumatoide y
 - 25 polimiositis/dermatomiositis; exposiciones laborales y ambientales, que incluyen por ejemplo, exposición al polvo y a ciertos gases, tóxicos, quimioterapia y radioterapia.

- En la EPI, el tejido de los pulmones se inflama y/o desarrolla lesiones cicatriciales. El intersticio del pulmón incluye el área situada en y alrededor de los pequeños vasos sanguíneos y los alvéolos (sacos aéreos) donde tiene lugar el
- 30 intercambio de oxígeno y dióxido de carbono. La inflamación y las lesiones cicatriciales del intersticio trastornan este tejido y conducen a una disminución en la capacidad de los pulmones de extraer oxígeno del aire.

- La progresión de la EPI varía según la enfermedad y de unas personas a otras. Dado que la enfermedad pulmonar intersticial trastoca la transferencia de oxígeno y dióxido de carbono en los pulmones, sus síntomas se manifiestan
- 35 normalmente en forma de problemas de la respiración. Los dos síntomas más comunes de la EPI son disnea con el ejercicio y una tos no productiva.

- El **síndrome de Usher** es la dolencia más común que afecta al oído y a la vista. Los síntomas principales del síndrome de Usher son pérdida de audición y retinitis pigmentaria (RP). La RP provoca ceguera nocturna y pérdida
- 40 de visión periférica (visión lateral) a través de la degeneración progresiva de la retina. A medida que la RP evoluciona, el campo de visión se estrecha hasta que queda sólo visión central. Muchas personas con síndrome de Usher tienen también graves problemas de equilibrio. Aproximadamente del 3 al 6% de los niños sordos y otro 3 al 6% de los niños con problemas de audición padecen síndrome de Usher. En los países desarrollados como los Estados Unidos, aproximadamente cuatro niños de cada 100.000 nacidos tienen síndrome de Usher. El síndrome de
 - 45 Usher se hereda como un rasgo autosómico recesivo. Con el síndrome de Usher se han asociado varios loci genéticos que incluyen la histidil-tRNA sintetasa (Puffenberger y col., (2012) *PLoS ONE* 7 (1) e28936 doi: 10.1371/journal.pone.0028936)

- Existen tres tipos clínicos de síndrome de Usher: tipo 1, tipo 2, y tipo 3. En los Estados Unidos, los tipos 1 y 2 son los
- 50 más comunes. En conjunto, suponen aproximadamente del 90 al 95% de todos los casos de niños que tienen síndrome de Usher.

- Los niños con síndrome de Usher de tipo 1 tienen sordera profunda al nacer y presentan graves problemas de equilibrio. Debido a los problemas de equilibrio asociados con el síndrome de Usher de tipo 1, los niños con este
- 55 trastorno tardan más en sentarse sin apoyo y normalmente no pueden andar de forma independiente hasta que tienen 18 meses. Estos niños suelen empezar a desarrollar problemas de vista en la primera infancia, casi siempre cuando llegan a los 10 años de edad. Los problemas de vista empiezan muy a menudo con dificultad para ver de noche, pero suelen progresar rápidamente hasta que la persona queda completamente ciega.

- 60 Los niños con síndrome de Usher de tipo 2 nacen con pérdida de audición moderada o grave y equilibrio normal. Aunque la gravedad de la pérdida de audición varía, la mayor parte de estos niños pueden beneficiarse del uso de

audífonos y pueden comunicarse oralmente. Los problemas de vista en el síndrome de Usher de tipo 2 suelen progresar más lentamente que en el tipo 1, y el inicio de la RP a menudo no se descubre hasta la adolescencia.

Los niños con síndrome de Usher de tipo 3 tienen audición normal al nacer. Aunque la mayoría de los niños con el trastorno tienen un equilibrio normal o casi normal, algunos pueden desarrollar problemas de equilibrio más adelante. El oído y la vista empeoran con el tiempo, pero la velocidad a la que se deterioran puede variar de una persona a otra dentro incluso de la misma familia. Una persona con síndrome de Usher de tipo 3 puede desarrollar pérdida de audición en la adolescencia, y normalmente necesitará audífonos a mediados o finales de la edad adulta. La ceguera nocturna suele empezar en algún momento durante la pubertad. Hacia el final de la adolescencia o principios de la edad adulta aparecen manchas ciegas, y, mediada la edad adulta, la persona suele considerarse legalmente ciega.

El **síndrome de Perrault (SP)** se caracteriza por la asociación de disgenia ovárica en las mujeres con deterioro de la audición con deterioro neurosensorio, y en algunas personas, anomalías neurológicas, que incluyen ataxia cerebelosa progresiva y déficit intelectual. La prevalencia exacta del síndrome de Perrault se desconoce, y probablemente está diagnosticado insuficientemente, en particular en varones en los que el hipogonadismo no es un rasgo de presentación y el síndrome se mantiene no detectado. La media de edad en el diagnóstico es 22 años después de la presentación con retraso de la pubertad en las mujeres con sordera neurosensorio. Los defectos de audición se observaron en todos salvo uno de los casos referidos (media de edad en el diagnóstico de 8 años). La pérdida de audición es siempre neurosensorio y bilateral pero la gravedad es variable (de leve a profunda), incluso en pacientes afectados de la misma familia. La disgenia ovárica se ha comunicado en todos los casos de mujeres, pero en los hombres no se han detectado defectos gonadales. La amenorrea suele ser primaria aunque también se ha referido amenorrea secundaria. En la mitad de los casos documentados (altura por debajo del percentil tres) se refirió retraso en el crecimiento. La frecuencia exacta de las anomalías neurológicas se desconoce, aunque se han comunicado casos de nueve mujeres y dos hombres (16-37 años de vida) sin anomalías neurológicas. Los signos neurológicos son progresivos y en general aparecen más tarde en la vida, aunque se ha observado retraso en la deambulación o caídas tempranas frecuentes en los pacientes jóvenes con SP. Los signos neurológicos comunes son ataxia, dispraxia, movimientos extraoculares limitados y polineuropatía. Se han comunicado también algunos casos con escoliosis. La transmisión del SP es autosómica recesiva y recientemente se han identificado mutaciones en la histidil-tRNA sintetasa mitocondrial que provocan la disgenia ovárica y la pérdida de audición neurosensorio asociada con el síndrome de Perrault. (Pierce y col., (2011) *PNAS USA*. 108(16) 6543-6548).

La **distrofia muscular** se refiere a un grupo de trastornos hereditarios en los que la fuerza y el volumen muscular disminuyen gradualmente. Todas las distrofias musculares se caracterizan por debilidad muscular que es alimentada por un defecto genético primario en uno o más genes específicos del músculo. Además las distrofias musculares tienen normalmente un componente inflamatorio variable que provoca inflamación muscular y en última instancia potencia la degeneración de los tejidos musculares. En general se reconocen al menos nueve tipos de distrofias musculares.

Distrofia muscular de Duchenne (DMD): la DMD afecta a varones jóvenes y provoca debilidad muscular progresiva, que empieza normalmente en las piernas. Es la forma más grave de distrofia muscular. La DMD se produce aproximadamente en 1 de cada 3.500 varones nacidos, y afecta aproximadamente a 8.000 chicos y jóvenes en los Estados Unidos. Aparece una forma más leve en muy pocas mujeres portadoras.

La DMD es causada por mutaciones en el gen que codifica la distrofina, una proteína del subsarcolemma que actúa en el complejo de glucoproteínas asociado a la distrofina (DGC) que impide la producción de proteína funcional. La cantidad de distrofina está correlacionada con la gravedad de la enfermedad (es decir, cuando menor es la distrofina presente, más grave es el fenotipo). El complejo DGC conecta el citoesqueleto intracelular con la matriz extracelular. El DGC se concentra en las líneas del sarcómero y confiere la transmisión de fuerza a través de la fibra muscular. La perturbación de este enlace produce inestabilidad de la membrana, que termina por producir rupturas del sarcolemma. El flujo de calcio extracelular altera procesos moleculares como la contracción muscular y activa la actividad proteolítica. Las fibras musculares afectadas se vuelven necróticas o apoptóticas, y liberan quimioatrayentes mitógenos, que inician los procesos inflamatorios. Los ciclos de degeneración y regeneración terminan por producir degeneración muscular irreversible y sustitución por tejido fibrótico y adiposo.

Un niño con distrofia muscular de Duchenne empieza normalmente a mostrar síntomas en edad preescolar. Primero afecta a las piernas, con lo que dificulta la deambulación y provoca problemas de equilibrio. La mayoría de los pacientes empiezan a andar entre tres y seis meses después de lo esperado y tienen dificultad para correr. Las contracturas (endurecimiento muscular permanente) suelen empezar a los cinco o seis años de edad, y son más intensas en los músculos de la pantorrilla. A esta edad es común que empiecen las caídas frecuentes y las fracturas óseas. A los nueve o diez años se hace imposible subir escaleras o levantarse sin ayuda, y la mayoría de los chicos

afectados de 12 años se mueven en silla de ruedas. El debilitamiento de los músculos del tronco en torno a esta edad produce a menudo escoliosis (una curvatura lateral de la columna) y cifosis (una curvatura anteroposterior).

Una de las debilidades más graves asociadas a DMD es la debilidad del diafragma, la lámina de músculos situada en la parte superior del abdomen que realiza el trabajo principal de la respiración y la tos. La debilidad del diafragma conduce a una reducción de la energía y el impulso, y a un aumento de las infecciones pulmonares debido a la imposibilidad de toser de manera efectiva. Los varones jóvenes con DMD pueden vivir veinte años y más, siempre y cuando dispongan de asistencia de ventilación mecánica y una buena higiene respiratoria.

En algunas realizaciones de la presente descripción, un sujeto que tiene DMD se caracteriza por uno o más de entre los siguientes aspectos: signo de Gower positivo, deterioro reflejo de los músculos de las extremidades inferiores; altos niveles de creatina cinasa (CPK-MM) en la sangre; errores genéticos en el gen Xp21; o niveles reducidos o ausencia de distrofina, por ejemplo, medido mediante biopsia muscular.

Las composiciones de HRS pueden usarse en el tratamiento de DMD, en solitario o en combinación con otras terapias, tales como oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, terapias de salto de exones tales como Eteplirsén), corticosteroides, agonistas beta2, fisioterapia, soporte respiratorio, terapias con células madre y terapias génicas de sustitución. En algunas realizaciones de la presente descripción, la administración de polipéptidos de HRS conduce a mejoras estadísticamente significativas en la prueba de deambulación de 6 minutos.

Distrofia muscular de Becker (DMB): la DMB afecta a chicos y varones jóvenes, según un curso más leve que la DMD. La DMB aparece aproximadamente en 1 de cada 30.000 varones nacidos. La distrofia muscular de Becker es una variante menos grave de la distrofia muscular de Duchenne y está provocada por la producción de una forma de distrofina truncada, pero parcialmente funcional.

Los síntomas de DMB aparecen normalmente desde el final de la infancia al principio de la edad adulta. Se cree que la progresión de los síntomas puede discurrir en paralelo con la de la DMD, los síntomas son normalmente más leves y el curso más variable. Puede aparecer escoliosis, aunque normalmente es más leve y evoluciona más lentamente. La enfermedad del músculo cardíaco (cardiomiopatía), es más común en la DMB. Los problemas pueden incluir latidos cardíacos irregulares (arritmias) e insuficiencia cardíaca congestiva. Los síntomas pueden incluir fatiga, disnea, dolor torácico y mareo. También se produce debilidad respiratoria, y puede conducir a la necesidad de ventilación mecánica.

Distrofia muscular de Emery-Dreifuss (DMEM): la DMEM afecta a varones jóvenes, y provoca contracturas y debilidad en las pantorrillas, debilidad en los hombros y la parte alta de los brazos, y problemas en la forma en que se desplazan los impulsos eléctricos a través del corazón para hacerlo latir (defectos en la conducción cardíaca). Existen tres subtipos de distrofia muscular de Emery-Dreifuss, diferenciables por su patrón de herencia: ligada al cromosoma X, autosómica dominante y autosómica recesiva. La forma ligada al cromosoma X es la más común. Cada tipo varía en su prevalencia y sus síntomas. La enfermedad es provocada por mutaciones en el gen LMNA, o más comúnmente, el gen EMD. Estos dos genes codifican componentes de proteínas de la envoltura nuclear.

La DMEM comienza normalmente en la primera infancia, a menudo con contracturas que preceden a debilidad muscular. La debilidad afecta originalmente al hombro y a la parte alta del brazo, junto con los músculos de la pantorrilla, y conduce a una postura de pie caído. La mayoría de los afectados por DMEM sobreviven hasta la mediana edad, aunque un defecto en el ritmo del corazón (bloqueo cardíaco) puede ser letal si no se trata con un marcapasos.

Distrofia muscular de cinturas y miembros (DMCM): la DMCM comienza en la infancia tardía o al principio de la edad adulta y afecta a hombres y a mujeres, causando debilidad en los músculos de las caderas y los hombros. Es la más variable de las distrofias musculares, y existen varias formas diferentes de la enfermedad hoy reconocidas. Muchas personas con sospecha de DMCM probablemente fueron objeto en el pasado de un diagnóstico erróneo, y por tanto la prevalencia de la enfermedad es difícil de estimar. El número de personas afectadas en los Estados Unidos puede situarse en algunos miles.

Aunque existe al menos media docena de genes que provocan los distintos tipos de DMCM, normalmente se reconocen dos formas clínicas principales de DMCM. Una forma infantil grave tiene una apariencia similar a la DMD, pero se hereda como un rasgo autosómico recesivo.

La distrofia muscular de cintura y miembros tipo 2B (DMCM2B) es causada por mutaciones de pérdida de función en el gen disferlina. La disferlina se expresa principalmente en el músculo esquelético y cardíaco, pero también en monocitos, macrófagos y otros tejidos donde se localiza en las vesículas citoplásmicas y la membrana celular. La

disferlina parece intervenir en la fusión y tráfico de membrana, así como en procesos de reparación. La DMCM2B es una enfermedad muscular de inicio tardío (adolescentes/adultos jóvenes) que se caracteriza por debilidad muscular simétrica progresiva, y notablemente patología inmunitaria/inflamatoria agresiva. Las biopsias musculares muestran normalmente un acusado infiltrado celular inflamatorio, consistente principalmente en macrófagos/marcadores de activación de macrófagos (HLA-DR, HLA-ABC, CD86), linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y linfocitos T CD4⁺, junto con degeneración/regeneración de fibras musculares.

Los síntomas de la DMCM de inicio adulto aparecen normalmente en la segunda o tercera década de vida, y se caracterizan por debilidad y agotamiento progresivos de los músculos más cercanos al tronco. Pueden producirse contracturas, y la capacidad de caminar se pierde normalmente aproximadamente 20 años después del inicio. Algunas personas con DMCM desarrollan debilidad respiratoria que exige el uso de un ventilador. La esperanza de vida puede verse acortada. (Las formas autosómicas dominantes aparecen normalmente más tarde en la vida y tienen una evolución relativamente lenta).

- 15 **Distrofia muscular facioescapulohumeral (FEH):** la FEH, también conocida como enfermedad de Landouzy-Dejerine, empieza entre la infancia tardía y los principios de la edad adulta y afecta tanto a hombres como a mujeres, causando debilidad en los músculos de la cara, los hombros y la parte alta de los brazos. Las caderas y las piernas también pueden verse afectadas. La FEH se produce aproximadamente en 1 de cada 20.000 personas, y afecta a aproximadamente 13.000 personas en los Estados Unidos.

20 La FEH varía en su gravedad y en la edad de inicio, incluso entre los miembros de la misma familia. Los síntomas se inician con la máxima frecuencia al final de la adolescencia o al principio de la veintena, aunque es posible su inicio en la lactancia o durante la infancia. Los síntomas suelen ser más graves en las personas con inicio más temprano. La enfermedad recibe el nombre según las regiones del cuerpo más seriamente afectadas por la enfermedad: los músculos de la cara (facio-), los hombros (escapulo-) y la parte alta de los brazos (humeral). También pueden verse afectadas las caderas y las piernas. Los niños con FEH a menudo desarrollan sordera parcial o completa.

Se necesitan dos defectos para la EFEH, el primero es la delección de repeticiones de D4Z4 y el segundo una "ganancia tóxica de función" del gen DUX4. El primer síntoma observado es a menudo la dificultad de levantar objetos por encima de los hombros. La debilidad puede ser mayor en un lado que en el otro. La debilidad de los hombros hace también que el hombro tenga una prominencia posterior, denominada escápula alada.

Distrofia miotónica: La distrofia miotónica, también conocida como enfermedad de Steinert, afecta tanto a hombres como a mujeres, y provoca una debilidad generalizada que se observa primero en la cara, los pies y las manos. Se acompaña por la incapacidad de relajar los músculos afectados (miotonía). Los síntomas pueden empezar en un periodo comprendido entre el parto y la edad adulta. La distrofia muscular miotónica de tipo 1 (DM1) es la forma más común de distrofia muscular, y afecta a más de 30.000 personas en los Estados Unidos. Procede de la expansión de una repetición corta (CTG) en la secuencia de ADN del gen DMPK (distrofia miotónica proteína cinasa). La distrofia muscular miotónica de tipo 2 (DM2) es mucho más rara y se produce por la expansión de la repetición CCTG en el gen ZNF9 (proteína de dedo de cinc 9).

Los síntomas de distrofia miotónica incluyen debilidad facial y flojedad mandibular, párpados caídos (ptosis) y degeneración muscular en los antebrazos y las pantorrillas. Una persona con esta distrofia tiene dificultad para relajar el agarre, especialmente si el objeto está frío. La distrofia miotónica afecta al músculo cardíaco, provocando arritmias y bloqueo cardíaco, y a los músculos del sistema digestivo, conduciendo a trastornos de la motilidad y estreñimiento. Otros sistemas corporales se ven también afectados: la distrofia miotónica puede provocar cataratas, degeneración de la retina, CI bajo, calvicie frontal, trastornos de la piel, atrofia testicular, apnea del sueño y resistencia a la insulina. Es común una mayor necesidad o deseo de dormir, ya que se reduce la motivación. Una discapacidad severa afecta a la mayoría de las personas con este tipo de distrofia en un plazo de 20 años desde su inicio, aunque en su mayor parte no necesitan silla de ruedas incluso en fases tardías de la vida. Pueden usarse composiciones de HRS para tratar la distrofia miotónica, por ejemplo, reduciendo la inflamación asociada con el tejido muscular, que incluye el músculo esquelético (por ejemplo, músculos del cuádriceps) y/o el tejido cardíaco, entre otros tejidos.

55 **Distrofia muscular oculofaríngea (DMOF):** la DMOF afecta a adultos de los dos sexos, y provoca debilidad en los músculos oculares y la garganta. Es más común entre las familias francocanadienses de Quebec y las familias hispanas del sudoeste de los Estados Unidos.

La DMOF se inicia normalmente en la cuarta o la quinta década de vida, con debilidad en los músculos que controlan los ojos y la garganta. Los síntomas incluyen párpados caídos, dificultad en la deglución (disfagia) y debilidad que evoluciona hacia otros músculos de la cara, el cuello, y ocasionalmente las extremidades superiores.

La dificultad en la deglución puede provocar aspiración, o la introducción de alimento o saliva en las vías respiratorias. Como consecuencia puede producirse neumonía.

Distrofia muscular distal (DD): la DD comienza en la mediana edad o más tarde y provoca debilidad en los músculos de los pies y las manos. Es más común en Suecia y es rara en otras partes del mundo. La DD comienza normalmente en la veintena o la treintena, con debilidad en las manos, los antebrazos y la parte inferior de las piernas. Las dificultades en los movimientos finos como escribir a máquina o abrocharse los botones pueden ser los primeros síntomas. Los síntomas avanzan lentamente, y la enfermedad normalmente no afecta a la esperanza de vida.

Distrofia muscular congénita (DMC): la DMC está presente desde el nacimiento, produce debilidad generalizada y normalmente evoluciona con lentitud. Un subtipo, denominado DMC de Fukuyama, implica también retraso mental. Las dos son raras; la DMC de Fukuyama es más común en Japón.

La DMC se caracteriza por debilidad muscular grave desde el nacimiento, donde los lactantes muestran "flojedad" y muy pocos movimientos voluntarios. No obstante, un niño con DMC puede aprender a andar, con o sin dispositivos de ayuda, y puede llegar a la edad adulta y aún más. En cambio, los niños con DMC de Fukuyama raras veces pueden andar y tienen un retraso mental grave. La mayoría de los niños con este tipo de DMC mueren durante la infancia.

Caquexia: la caquexia (o síndrome de desgaste) se caracteriza normalmente por pérdida de peso, degeneración muscular, fatiga, debilidad y pérdida importante del apetito en una persona que no intenta activamente perder peso. La definición formal de caquexia es la pérdida de masa corporal que no puede invertirse nutricionalmente. Incluso si el paciente afectado consume más calorías, se pierde masa corporal magra, lo que indica la existencia de una patología primaria.

Sufren caquexia los pacientes con cáncer, SIDA, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, esclerosis múltiple, insuficiencia cardíaca congestiva, tuberculosis, polineuropatía amiloide familiar, intoxicación por mercurio (acrodinia), y deficiencia hormonal, entre otras enfermedades.

La caquexia puede ser también un signo de diversos trastornos subyacentes, que incluyen cáncer, acidosis metabólica (es decir, reducción en la síntesis de proteínas y aumento en el catabolismo de proteínas), algunas enfermedades infecciosas (por ejemplo, tuberculosis, SIDA), pancreatitis crónica, trastornos autoinmunitarios o adicción a las anfetaminas. La caquexia debilita físicamente a los pacientes hasta un estado de inmovilidad que se deriva de pérdida de apetito, astenia y anemia, y la respuesta al tratamiento estándar suele ser baja.

Aproximadamente el 50% de los pacientes con cáncer sufren caquexia. Los afectados por cánceres del aparato digestivo superior y el páncreas tienen la máxima frecuencia de desarrollo de un síntoma de caquexia. Además de incrementar la morbilidad y la mortalidad, el agravamiento de los efectos secundarios de la quimioterapia y la reducción de calidad de vida, la caquexia se considera la causa inmediata de muerte de una gran proporción de pacientes con cáncer, que comprende del 22% al 40% de los pacientes. Los síntomas de caquexia asociada al cáncer incluyen pérdida de peso progresiva y agotamiento de las reservas del hospedador de tejido adiposo y músculo esquelético. Los abordajes terapéuticos tradicionales incluyen el uso de estimulantes del apetito, antagonistas 5-HT₃, suplemento de nutrientes e inhibidores de COX-2.

Aunque la patogenia de la caquexia no se conoce bien, se espera que intervengan múltiples vías biológicas, que incluyen citocinas proinflamatorias tales como TNF- α , hormonas neuroendocrinas, IGF-1 y factores específicos de tumores tales como un factor inductor de proteólisis.

Las composiciones de HRS pueden usarse así para la tratar caquexia y cualquiera de sus trastornos o complicaciones relacionados, subyacentes o secundarios. Las composiciones de HRS pueden usarse en solitario o en combinación con otras terapias, tales como suplemento dietético con una combinación de alto contenido de proteínas, leucina y aceite de pescado, antioxidantes, progestágeno (acetato de megestrol, acetato de medroxiprogesterona) y fármacos de anticiclooxygenasa-2, estimulantes del apetito y antagonistas de 5-HT₃, entre otros.

Rabdomiólisis: la rabdomiólisis es la descomposición de las fibras musculares en tejido del músculo esquelético. Los productos de descomposición son liberados en el torrente sanguíneo, y algunos de estos productos, tales como la mioglobina, son dañinos para los riñones y pueden producir insuficiencia renal.

Los síntomas incluyen dolor muscular, vómitos, confusión, coma o anomalías en la frecuencia y el ritmo cardíacos y

su gravedad depende normalmente de la magnitud del daño muscular y de si se desarrolla insuficiencia renal. El daño en los riñones puede provocar disminución o ausencia de producción de orina, normalmente aproximadamente de 12 a 24 horas después del daño inicial en el músculo. La tumefacción del músculo dañado puede provocar síndrome compartimental, o la compresión de los tejidos circundantes, como nervios y vasos sanguíneos, en el mismo compartimento fascial, y produce pérdida de sangre y daños (por ejemplo, pérdida de función) en las partes del cuerpo afectadas. Los síntomas de esta complicación incluyen dolor o menor sensibilidad en la extremidad afectada. Otras complicaciones incluyen coagulación intravascular diseminada (CID), una perturbación grave de la coagulación sanguínea que puede provocar una hemorragia incontrolable.

- 10 El daño muscular inicial puede estar provocado, por ejemplo, por factores físicos (por ejemplo, lesión por aplastamiento, ejercicio agotador), alteración en el aporte sanguíneo (por ejemplo, trombosis arterial, embolia), alteración del metabolismo (por ejemplo, estado hiperosmolar hiperglucémico, hipernatremia y hiponatremia, hipopotasemia, hipocalcemia, hipofosfatemia, cetoacidosis, hipotiroidismo), alteración de la temperatura corporal (hipertermia, hipotermia), medicamentos y toxinas (por ejemplo, estatinas, medicamentos antipsicóticos, agentes de bloqueo neuromuscular, diuréticos, metales pesados, cicuta, venenos de insectos o serpientes), consumo de sustancias (por ejemplo, alcohol, anfetaminas, cocaína, heroína, ketamina, LDS, MDMA), infecciones (por ejemplo, virus de Cocksackie, virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus de Epstein-Barr, infección primaria por VIH, *Plasmodium falciparum*, virus del herpes, *Legionella pneumophila*, salmonela) y daño muscular autoinmunitario (por ejemplo, polimiositis, dermatomiositis). Además, algunas afecciones hereditarias incrementan el riesgo de rabdomiólisis, entre las que se incluyen defectos de glucólisis y glucogenólisis (por ejemplo, enfermedad de McArdles, deficiencia de fosfofructocinasa, enfermedades de almacenamiento del glucógeno VIII, IX, X y XI), defectos del metabolismo de los lípidos (por ejemplo, deficiencia carnitina palmitoiltransferasa I y II, deficiencia de subtipos de acilo CoA deshidrogenasa (por ejemplo, LCAD, SCAD, MCAD, VLCAD, deficiencia de 3-hidroxiacil-coenzima A deshidrogenasa), deficiencia de tiolasa), miopatías mitocondriales (por ejemplo, deficiencia de succinato deshidrogenasa, citocromo c oxidasa y coenzima Q10) y otros tales como deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, deficiencia de mioadenilato desaminasa y distrofias musculares.

- La rabdomiólisis se diagnostica normalmente con análisis de sangre y de orina, y puede estar indicada por niveles anómalamente elevados o en aumento de creatinina y urea, descenso en la producción de orina o decoloración rojiza-parda de la orina. Los tratamientos primarios incluyen líquidos intravenosos, diálisis y hemofiltración.

- Las composiciones de HRS pueden usarse así para tratar la rabdomiólisis y cualquiera de sus trastornos o complicaciones relacionados, secundarios o subyacentes. Las composiciones de HRS pueden usarse en solitario o en combinación con otras terapias, que incluyen las incluidas para tratar el shock y preservar la función renal. Las terapias de ejemplo incluyen administración de líquidos intravenosos, normalmente solución salina isotónica (0,9% en peso por volumen de solución de cloruro de sodio) y terapias de sustitución renal (TSR) tales como hemodiálisis, hemofiltración continua y diálisis peritoneal.

- Más en general, los polipéptidos de HRS descritos en la presente memoria pueden reducir una respuesta inflamatoria, por ejemplo reduciendo la migración o infiltrado de células inmunitarias en tejidos seleccionados, lo que aumenta la producción de citocinas antiinflamatorias o reducción de la producción o actividad de citocinas proinflamatorias, entre otros mecanismos.

- Por consiguiente, los polipéptidos de HRS de la presente descripción pueden usarse para modular la inflamación aguda, la inflamación crónica o ambas. Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a un aumento de la inflamación aguda o de las respuestas inflamatorias agudas, y algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a un aumento de la inflamación crónica o de las respuestas inflamatorias crónicas. Dependiendo de las necesidades del sujeto, algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la reducción de la inflamación o las respuestas inflamatorias agudas, y algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la reducción de la inflamación crónica o las respuestas inflamatorias crónicas.

- La inflamación aguda se refiere a la respuesta inicial del organismo a estímulos presumiblemente dañinos e implica un aumento del movimiento de plasma y leucocitos desde la sangre a los tejidos dañados. Es un proceso a corto plazo, que comienza normalmente en unos minutos u horas y termina tras la retirada del estímulo nocivo. La inflamación aguda puede caracterizarse por uno cualquiera o más de entre rubefacción, aumento del calor, tumefacción, dolor y pérdida de función. La rubefacción y el calor se deben principalmente a un aumento del flujo sanguíneo a la temperatura central del cuerpo en el sitio inflamado, la tumefacción se debe a la acumulación de líquido, el dolor se debe normalmente a la liberación de sustancias químicas que estimulan las terminaciones nerviosas y la pérdida de función tiene múltiples causas.

- Las respuestas inflamatorias agudas son iniciadas principalmente por células inmunitarias locales, tales como

- macrófagos residentes, células dendríticas, linfocitos, células de Kupffer y linfocitos T. En el comienzo de una infección, por quemaduras u otras lesiones, estas células experimentan activación y liberan mediadores inflamatorios responsables de los signos clínicos de inflamación, tales como aminas y eicosanoides vasoactivos. La vasodilatación y su aumento resultante en el flujo sanguíneo provocan la rubefacción y el aumento de calor. El incremento de permeabilidad de los vasos sanguíneos produce una exudación o filtrado de proteínas plasmáticas y líquido al tejido, lo que crea la tumefacción. Algunos mediadores liberados tales como la bradicinina aumentan la sensibilidad al dolor, y modifican los vasos sanguíneos para permitir la migración o extravasación de leucocitos, tales como neutrófilos, que normalmente migran a lo largo de un gradiente quimiotáctico creado por las células inmunitarias locales.
- 10 Las respuestas inflamatorias agudas incluyen también uno o más sistemas de cascadas bioquímica acelulares, que consisten en proteínas plasmáticas preformadas modulada, que actúan en paralelo para iniciar y propagar la respuesta inflamatoria. Estos sistemas incluyen el sistema de complemento, que es activado principalmente por bacterias, y los sistemas de coagulación y fibrinólisis, que son activados principalmente por necrosis, tales como el tipo de daño tisular que está provocado por ciertas infecciones, quemaduras u otros traumatismos. Por ello, los polipéptidos de HRS pueden usarse para modular la inflamación aguda, o una cualquiera o más de entre las respuestas inflamatorias agudas individuales.
- 15 La inflamación crónica, una respuesta inflamatoria prolongada y retardada, se caracteriza por un desplazamiento progresivo en el tipo de células que están presentes en el sitio de inflamación, y a menudo conduce a una destrucción simultánea o casi simultánea y a la cicatrización del tejido a partir del proceso inflamatorio. A escala celular, en las respuestas inflamatorias crónicas intervienen diversas células inmunitarias tales como monocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y fibroblastos, aunque a diferencia de la inflamación aguda, que está mediada principalmente por granulocitos, la inflamación crónica está mediada principalmente por células mononucleares tales como monocitos y linfocitos. La inflamación crónica también implica diversos mediadores inflamatorios, tales como IFN- γ y otras citocinas, factores de crecimiento, especies de oxígeno reactivas y enzimas hidrolíticas. La inflamación crónica puede durar muchos meses o años, y puede provocar destrucción indeseada de los tejidos y fibrosis.
- 20 Los signos clínicos de inflamación crónica dependen de la duración de la dolencia, las lesiones inflamatorias, la causa y el área anatómica afectada, (véase, por ejemplo, Kumar y col., Robbins Basic Pathology-S^{IA} Ed., 2009 Elsevier, Londres; Miller, LM, Pathology Lecture Notes, Atlantic Veterinary College, Charlottetown, PEI, Canadá). La inflamación crónica está asociada con diversos estados patológicos o enfermedades, que incluyen, por ejemplo, alergias, enfermedad de Alzheimer, anemia, estenosis valvular aórtica, artritis tales como artritis reumatoide y artrosis, cáncer, insuficiencia cardíaca congestiva, fibromialgia, fibrosis, ataque al corazón, insuficiencia renal, lupus, pancreatitis, accidente cerebrovascular, complicaciones quirúrgicas, enfermedad inflamatoria pulmonar, enfermedad inflamatoria intestinal, aterosclerosis y psoriasis, entre otros descritos en la presente memoria y conocidos en la técnica. Por ello, los polipéptidos de HRS pueden usarse para tratar o manejar la inflamación crónica, modular una cualquiera o más de entre las respuestas inflamatorias crónicas individuales o tratar una cualquiera o más enfermedades o afecciones asociadas con inflamación crónica.
- 30 Los polipéptidos de HRS también pueden modular la inflamación proliferativa, un proceso inflamatorio caracterizado por un aumento en el número de células de tejidos. Estos pueden comprender trastornos de la piel tales como psoriasis, seborrea o eczema, o también pueden verse en términos de cánceres y crecimientos anómalos especialmente a la luz de la acumulación de evidencias basadas en procedimientos moleculares más eficientes para documentar incluso un grado bajo de inflamación crónica.
- 35 En algunas realizaciones de la presente descripción, los polipéptidos de HRS pueden modular respuestas inflamatorias a escala celular, tales como la modulación de la activación, la secreción de moléculas inflamatorias (por ejemplo, secreción de citocina o cinina), la proliferación, la actividad, la migración o la adhesión de diversas células implicadas en la inflamación. Los ejemplos de dichas células incluyen células inmunitarias y células vasculares. Las células inmunitarias incluyen, por ejemplo, granulocitos tales como neutrófilos, eosinófilos y basófilos, macrófagos/monocitos, linfocitos tales como linfocitos B, linfocitos T citolíticos (es decir, linfocitos T CD8+), linfocitos T auxiliares (es decir, linfocitos T CD4+, que incluyen linfocitos T1 y T2), células citolíticas naturales y linfocitos T δ , células dendríticas y mastocitos. Los ejemplos de células vasculares incluyen células de músculo liso, células endoteliales y fibroblastos. Se incluyen también procedimientos para modular una afección inflamatoria asociada con una o más células inmunitarias o células vasculares, que incluye afecciones inflamatorias mediadas por neutrófilos, mediadas por macrófagos y mediadas por linfocitos.
- 40 En algunas realizaciones de la presente descripción, los polipéptidos de HRS modulan la inflamación local, la inflamación sistémica o ambas. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS puede

reducir o mantener (es decir, evitar aumentos adicionales) la inflamación local o las respuestas inflamatorias locales. En algunas realizaciones de la presente descripción, dependiendo de las necesidades del sujeto, los polipéptidos de HRS pueden aumentar la inflamación local o las respuestas inflamatorias locales. En algunas realizaciones de la presente descripción, los polipéptidos de HRS pueden reducir o mantener (es decir, evitar aumentos adicionales) la inflamación sistémica o las respuestas inflamatorias sistémicas. En algunas realizaciones de la presente descripción, dependiendo de las necesidades del sujeto, los polipéptidos de HRS pueden aumentar la inflamación sistémica o las respuestas inflamatorias sistémicas.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la modulación de la inflamación o las respuestas inflamatorias pueden asociarse con uno o más tejidos u órganos. Los ejemplos no limitativos de dichos tejidos u órganos incluyen la piel (por ejemplo, dermis, epidermis, capa subcutánea), los folículos pilosos, el sistema nervioso (por ejemplo, encéfalo, médula espinal, nervios periféricos), el sistema auditivo o los órganos del equilibrio (por ejemplo, oído interno, oído medio, oído externo), el sistema respiratorio (por ejemplo, nariz, tráquea, pulmones), los tejidos gastroesofágicos, el sistema gastrointestinal (por ejemplo, boca, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, recto), el sistema vascular (por ejemplo, corazón, vasos sanguíneos y arterias), el hígado, la vesícula biliar, el sistema linfático/inmunitario (por ejemplo, ganglios linfáticos, folículos linfoides, bazo, timo, médula ósea), el sistema urogenital (por ejemplo, riñones, uréter, vejiga, uretra, cuello del útero, trompas de Falopio, ovarios, útero, vulva, próstata, glándulas bulbouretrales, epidídimo, próstata, vesículas seminales, testículos), el sistema musculoesquelético (por ejemplo, músculos esqueléticos, músculos lisos, hueso, cartílago, tendones, ligamentos), el tejido adiposo, las mamas y el sistema endocrino (por ejemplo, hipotálamo, hipófisis, tiroides, páncreas, glándulas suprarrenales). Por consiguiente, los polipéptidos de HRS pueden usarse para modular la inflamación asociada con cualquiera de estos tejidos u órganos, por ejemplo para tratar afecciones o enfermedades que se asocian con la inflamación de estos tejidos u órganos.

Tal como se indica anteriormente, algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear polipéptidos de HRS para reducir o manejar (es decir, prevenir un mayor aumento) la inflamación o las respuestas inflamatorias asociadas con tejidos u órganos concretos. Se incluyen respuestas y afecciones inflamatorias asociadas con la piel, lo que incluye inflamación, infecciones y cánceres asociados con las capas dérmica, epidérmica y subcutánea de la piel. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con la piel incluyen, sin limitación, dermatitis, tales como psoriasis, dermatitis irritante, dermatitis seborreica, dermatitis atópica (eczema), dermatitis de contacto alérgica, dermatitis de inducción térmica, dermatitis inducida por fármacos, dermatitis dishidrótica, urticaria, dermatitis autoinmunitaria, cáncer de piel tal como melanoma y dermatitis bullosa. Se incluyen también infecciones por bacterias, virus y parásitos, eritema multiforme, eritema nudoso, granuloma anular, roble venenoso/hiedra venenosa y necrólisis epidérmica tóxica.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la reducción de respuestas y afecciones inflamatorias asociadas con el sistema nervioso, que incluye inflamación, infecciones y cáncer asociado con el encéfalo y la médula espinal del sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico y las meninges. La expresión de mediadores inflamatorios que incluyen complemento, moléculas de adhesión, enzimas de ciclooxigenasa y sus productos y citocinas se incrementa en la enfermedad neurodegenerativa experimental y clínica, y los estudios de intervención en animales de experimento sugieren que varios de estos factores contribuyen directamente a la lesión neuronal. Por ejemplo, citocinas específicas, tales como interleucina-1 (IL-1), se han relacionado de forma acusada con la neurodegeneración aguda, tal como accidente cerebrovascular y lesión craneoencefálica.

Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas al sistema nervioso incluyen, sin limitación, meningitis (es decir, inflamación de las membranas protectoras que cubren el encéfalo y la médula espinal), mielitis, encefalomiелitis (por ejemplo, encefalomiелitis miálgica, encefalitis diseminada aguda, encefalomiелitis diseminada o esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmunitaria), aracnoiditis (es decir, inflamación del aracnoides, una de las membranas que rodean y protegen los nervios del sistema nervioso central), granuloma, inflamación o meningitis inducida por fármacos, enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, demencia por VIH, síndrome de Sly, CMT, retinopatía, pérdida de audición neurosensitiva, atrofia muscular espinal, encefalitis por ELA tal como encefalitis vírica y encefalitis bacteriana, infecciones por parásitos, trastornos de desmielinización inflamatorios y trastornos autoinmunitarios tales como enfermedades autoinmunitarias mediadas por linfocitos T CD8+ del SNC. Los ejemplos adicionales incluyen enfermedad de Parkinson, miastenia grave, neuropatía motora, síndrome de Guillain-Barré, neuropatía autoinmunitaria, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad neurológica paraneoplásica, atrofia cerebelosa paraneoplásica, síndrome de la persona rígida no paraneoplásico, atrofia cerebelosa progresiva, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatía autoinmunitaria, neuropatía disinmunitaria, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple, neuritis óptica y síndrome de la persona rígida.

Tal como se indica anteriormente, se incluye también la inflamación asociada con infecciones del sistema nervioso.

Los ejemplos específicos de infecciones bacterianas asociados con la inflamación del sistema nervioso incluyen, sin limitación, infección estreptocócica tal como estreptococos del grupo B (por ejemplo, subtipos III) y *Streptococcus pneumoniae* (por ejemplo, serotipos 6, 9, 14, 18 y 23), *Escherichia coli* (por ejemplo, que lleva antígeno K1), *Listeria monocytogenes* (por ejemplo, serotipo IVb), infección por *Neisseria* tal como *Neisseria meningitidis* (meningococos),
5 infección estafilocócica, infección por *Haemophilus* tal como *Haemophilus influenzae* tipo B, *Klebsiella* y *Mycobacterium tuberculosis*. Se incluyen también infecciones por estafilococos y pseudomonas y otros bacilos gramnegativos, principalmente con respecto a traumatismo craneoencefálico, que confiere a las bacterias de la cavidad nasal la capacidad de entrar en el espacio meníngeo, o en personas con derivación cerebral o un dispositivo relacionado (por ejemplo, drenaje extraventricular, reservorio de Ommaya). Los ejemplos específicos de infecciones
10 víricas asociados con la inflamación del sistema nervioso incluyen, sin limitación, enterovirus, virus del herpes simple tipo 1 y 2, virus T-linfotrófico humano, virus de la varicela zóster (varicela y herpes zóster), virus del sarampión, virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de coriomeningitis linfocitaria (VCML). La meningitis puede proceder también de infección por espiroquetas tales como *Treponema pallidum* (sífilis) y *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), parásitos tales como paludismo (por ejemplo, paludismo cerebral), hongos tales como *Cryptococcus*
15 neoformans y amebas tales como *Naegleria fowleri*.

La meningitis u otras formas de inflamación del sistema nervioso también pueden asociarse con la diseminación del cáncer a las meninges (meningitis maligna), algunos fármacos tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos e inmunoglobulinas intravenosas, sarcoidosis (o neurosarcoidosis), trastornos del tejido conjuntivo tales
20 como lupus eritematoso sistémico y ciertas formas de vasculitis (afecciones inflamatorias de las paredes de los vasos sanguíneos) tales como enfermedad de Behçet. Los quistes epidermoides y los quistes dermoides pueden causar meningitis al liberar materia irritante en el espacio subaracnoideo. Por consiguiente, los polipéptidos de HRS pueden usarse para tratar o manejar una cualquier o más de estas afecciones.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la reducción de las respuestas y afecciones inflamatorias asociadas con el sistema auditivo y los órganos del equilibrio, tales como el oído interno, el oído medio y el oído externo. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el sistema auditivo o los órganos del equilibrio incluyen, sin limitación, inflamación del oído externo (por ejemplo, infecciones del oído), inflamación del oído medio, que puede conducir a la acumulación de líquido en el espacio normalmente lleno de aire y la pérdida
30 asociada de conducción de la audición, laberintitis, una infección o inflamación del oído interno que provoca mareo (vértigo) y pérdida de audición, neuritis vestibular, una infección del nervio vestibular, en general vírica, que produce vértigo y neuritis coclear, una infección del nervio coclear, en general vírica, que provoca sordera súbita pero no vértigo. Los receptores de implantes cocleares por pérdida de audición tienen un riesgo mayor de meningitis neumocócica y su inflamación asociada.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la reducción de las respuestas y afecciones inflamatorias asociadas con el sistema respiratorio, que incluye inflamación, infecciones y cáncer asociados con la nariz, la tráquea y los pulmones. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el sistema respiratorio incluyen, sin limitación, enfermedades inflamatorias pulmonares, asma atópico, asma no atópico, asma alérgico,
40 asma mediado por IgE bronquial atópico, asma bronquial, asma esencial, asma verdadero, asma intrínseco causado por trastornos fisiopatológicos, asma extrínseco causado por factores ambientales, asma esencial de causa desconocida o no aparente, asma no atópico, asma bronquítico, asma enfisematoso, asma inducido por el ejercicio, asma inducido por alérgenos, asma inducido por aire frío, asma ocupacional, asma infeccioso causado por infección bacteriana, fúngica, por protozoos o vírica, asma no alérgico, asma incipiente, síndrome del bebé jadeante y
45 bronquiolitis, broncoconstricción aguda o crónica, bronquitis crónica, obstrucción de las pequeñas vías respiratorias y enfisema. Algunos ejemplos adicionales son enfermedades de las vías respiratorias obstructivas inflamatorias tales como neumonía eosinófila crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), EPOC que incluye bronquitis crónica, enfisema pulmonar o disnea asociada o no asociada con EPOC, EPOC que se caracteriza por obstrucción progresiva e irreversible de las vías respiratorias y síndrome de distrés respiratorio del adulto (SADR).

Los ejemplos adicionales de afecciones asociadas con inflamación pulmonar incluyen afecciones relacionadas con el agravamiento de la hiperreactividad de las vías respiratorias a consecuencia de otra farmacoterapia, enfermedad de las vías respiratorias que está asociada con hipertensión pulmonar, bronquitis tales como bronquitis aguda, bronquitis laringotraqueal aguda, bronquitis araquídica, bronquitis catarral, bronquitis por crup, bronquitis seca,
55 bronquitis asmática infecciosa, bronquitis productiva, bronquitis por estafilococos o estreptococos y bronquitis vesicular, lesión pulmonar aguda y bronquiectasia tal como bronquiectasia cilíndrica, bronquiectasia saculada, bronquiectasia fusiforme, bronquiectasia capilar, bronquiectasia quística, bronquiectasia seca y bronquiectasia folicular.

La EPOC se refiere en particular a un grupo de enfermedades pulmonares que bloquean el flujo de aire y dificultan crecientemente en las personas afectadas la capacidad de respirar normalmente. El enfisema y la bronquitis crónica

son las dos afecciones principales dentro del grupo de enfermedades de EPOC, pero la EPOC también puede referirse al daño causado por la bronquitis asmática crónica, entre otras afecciones conocidas en la técnica. En la mayoría de los casos, el daño en las vías respiratorias interfiere finalmente con el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono en los pulmones. Los tratamientos estándar se centran principalmente en controlar los síntomas y

5 minimizar daños adicionales.

El enfisema representa un aspecto de la EPOC. El enfisema lleva a una inflamación dentro de las paredes frágiles de los alvéolos, que puede destruir parte de las paredes y fibras elásticas, facilitando el colapso de las vías respiratorias pequeñas tras la espiración, y degradando el flujo de aire al exterior de los pulmones. Los signos y

10 síntomas de enfisema incluyen, por ejemplo, disnea, especialmente durante actividades físicas, sibilancias y tirantez torácica.

La bronquitis crónica representa otro aspecto de la EPOC. La bronquitis crónica se caracteriza por una tos permanente, y produce inflamación y estrechamiento de los tubos bronquiales. Esta afección también provoca

15 aumento de la producción de moco, que puede bloquear aún más los tubos estrechados. La bronquitis crónica aparece principalmente en fumadores, y normalmente se define como una tos que dura al menos tres meses al año durante dos años consecutivos. Los signos y síntomas de bronquitis crónica incluyen, por ejemplo, la necesidad de aclararse la garganta como primera acción de la mañana, especialmente en los fumadores, una tos crónica que produce esputo amarillento, disnea en las fases tardías y frecuentes infecciones respiratorias. Tal como se indica

20 anteriormente, la EPOC se refiere principalmente a obstrucción en los pulmones procedente de las dos afecciones pulmonares crónicas indicadas anteriormente. Sin embargo, muchas personas con EPOC tienen estas dos afecciones.

La bronquitis asmática crónica representa otro aspecto de la EPOC que se caracteriza normalmente como bronquitis

25 crónica combinada con asma (broncoespasmo). El asma puede producirse cuando las secreciones inflamadas e infectadas irritan los músculos lisos en las vías respiratorias. Los síntomas son similares a los de la bronquitis crónica, pero incluyen también episodios intermitentes, o incluso diarios, de sibilancias.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la EPOC puede tener también un componente autoinmunitario.

30 Por ejemplo, los linfocitos T del pulmón y la sangre periférica en pacientes con enfisema grave secretan citocinas Th1 y quimiocinas cuando se estimulan con péptidos de elastina in vitro, y estos pacientes poseen un mayor número del anticuerpo antielastina que los controles (véase Goswami y col., The Journal of Immunology. 178: 130,41, 2007). Además, los autoanticuerpos IgG con avidéz por el epitelio pulmonar, y la posibilidad de mediar en la citotoxicidad, son prevalentes en los pacientes con EPOC (véase Feghali-Bostwick y col., Am J Respir Crit Care Med. 177: 156-63,

35 2008). Dado que las respuestas inmunitarias autorreactivas pueden ser importantes en la etiología de esta enfermedad, lo que incluye, por ejemplo, respuestas autorreactivas a autoantígenos tales como la elastina, pueden desempeñar un papel en la EPOC, el uso de polipéptidos AARS para desensibilizar las células inmunitarias a estos antígenos puede reducir la inflamación pulmonar.

40 Tal como se indica anteriormente, algunas realizaciones de la presente descripción se refieren al uso de polipéptidos de HRS para desensibilizar células inmunitarias a antígenos seleccionados, lo que incluye autoantígenos y antígenos extraños, irritantes, alérgenos o agentes infecciosos relacionados con la inflamación pulmonar. Al desensibilizar estas células inmunitarias para un antígeno seleccionado, los polipéptidos de HRS pueden reducir la migración o reclutamiento de estas células a los pulmones, y con ello reducir la inflamación. Los ejemplos de células

45 inmunitarias incluyen linfocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos, tales como neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los ejemplos de antígenos incluyen, sin limitación, el humo tal como el humo de cigarrillos, la contaminación del aire, vapores como los vapores de la soldadura, el polvo, que incluye polvo de sílice y polvos del lugar de trabajo tales como los encontrados en la minería del carbón y la minería del oro, sustancias químicas tales como cadmio e isocianatos. Se incluyen también alérgenos conocidos y agentes infecciosos, tales como bacterianos

50 y víricos o antígenos, lo que incluye lipopolisacáridos (LPS), que pueden agravar la EPOC en personas sensibles.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la reducción de las respuestas y afecciones inflamatorias asociadas en el sistema gastrointestinal, que incluye inflamación, infecciones y cáncer asociados con la boca, el esófago, el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso y el recto. "Inflamación gastrointestinal" tal

55 como se usa en la presente memoria se refiere a la inflamación de una capa mucosa del tracto gastrointestinal, y comprende afecciones inflamatorias agudas y crónicas. La inflamación aguda se caracteriza en general por un tiempo breve de instauración e infiltrado o aflujo de neutrófilos. La inflamación crónica se caracteriza en general por un periodo relativamente más largo de instauración e infiltrado o aflujo de células mononucleares. La inflamación crónica puede caracterizarse también normalmente por periodos de remisión espontánea y aparición espontánea.

60 Se entiende que la "capa mucosa del tracto gastrointestinal" incluye la mucosa del intestino (que incluye el intestino

delgado y el intestino grueso), el recto, la mucosa (gástrica) del estómago, la cavidad oral y similares. "Inflamación gastrointestinal crónica" se refiere a inflamación de la mucosa del tracto gastrointestinal que se caracteriza por un periodo relativamente más prolongado de instauración, es duradera (por ejemplo, de varios días, semanas, meses, o años y hasta toda la vida del sujeto), y a menudo se asocia con infiltrado o aflujo de células mononucleares, y puede asociarse además con periodos de remisión espontánea y aparición espontánea. Las "afecciones inflamatorias gastrointestinales crónicas" (también referidas como "enfermedades inflamatorias gastrointestinales crónicas") que tienen dicha inflamación crónica incluyen, pero no se limitan a, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), colitis inducida por agresiones ambientales (por ejemplo, inflamación gastrointestinal asociada con un régimen terapéutico, tal como quimioterapia, radioterapia y similares), colitis en condiciones tales como enfermedad granulomatosa crónica (véase, por ejemplo, Schappi y col., Arch Dis Child. 84: 147-151, 2001), enfermedad celiaca, esprúe celiaco (es decir, una enfermedad hereditaria en la que la mucosa intestinal se inflama como respuesta a la ingestión de una proteína denominada gluten), alergias alimentarias, gastritis, gastritis infecciosa o enterocolitis (por ejemplo, gastritis crónica infectada por *Helicobacter pylori*) y otras formas de inflamación gastrointestinal causadas por un agente infeccioso, y otras dolencias similares.

Tal como se usa en la presente memoria, "enfermedad inflamatoria intestinal" o "EII" se refiere a cualquiera de una diversidad de enfermedades caracterizadas por inflamación de parte o la totalidad del intestino. Los ejemplos de enfermedad inflamatoria intestinal incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. El término EII incluye colitis pseudomembranosa, colitis hemorrágica, colitis por síndrome hemolítico-urémico, colitis de colágeno, colitis isquémica, colitis por radiación, colitis inducida por fármacos y sustancias químicas, colitis por desviación, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, síndrome del colon irritable y enfermedad de Crohn; y dentro de la enfermedad de Crohn todos los subtipos que incluyen enfermedad de Crohn activa, refractaria y fistulizante. Por ello, los polipéptidos de HRS pueden emplearse para tratar o manejar una cualquiera o más de estas dolencias.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la reducción de respuestas y afecciones inflamatorias asociadas con el sistema vascular, o inflamación vascular, tales como inflamación asociada con los vasos sanguíneos y el corazón. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas al sistema vascular incluyen, sin limitación, miocarditis, pericarditis, enfermedad oclusiva, aterosclerosis, infarto de miocardio, trombosis, enteropatía autoinmunitaria, cardiomiopatía, enfermedad de Kawasaki, artritis idiopática juvenil, granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki, enfermedad autoinmunitaria anti-factor VIII, vasculitis necrosante de los pequeños vasos, poliangitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrosante focal pauciinmunitaria, glomerulonefritis creciente, síndrome antifosfolípidos, insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos, purpura trombocitopénica, anemia hemolítica autoinmunitaria, autoinmunidad cardíaca en enfermedad de Chagas y autoinmunidad de anti-linfocitos T auxiliares. Se incluyen también endocarditis, o infección de las válvulas cardíacas con diseminación de pequeños grupos de bacterias a través del torrente sanguíneo, flebitis o vasculitis, inflamación de una o más venas y tromboflebitis, inflamación venosa relacionada con un trombo. La tromboflebitis puede producirse repetidamente en diferentes lugares, y entonces se refiere como tromboflebitis migrante o tromboflebitis migradora. La flebitis puede asociarse con diversas causas, tales como infección bacteriana, exposición a agentes químicos, tales como soluciones irritantes o vesicantes, traumatismo físico por punción de la piel tal como el movimiento de una cánula en una durante la inserción, medicamentos tales como Celebrex, Olancepina, antidepresivos y otros, y consumo abusivo de alcohol. Algunas realizaciones de la presente descripción pueden referirse al tratamiento o manejo de inflamación cardíaca causada por uno cualquiera o más de entre fiebre reumática aguda, toxoplasmosis congénita, infección prenatal por enterovirus, enfermedad de Lyme y fiebre reumática.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la reducción de respuestas y afecciones inflamatorias asociadas con el hígado o la vesícula biliar, que incluye inflamación hepática aguda y crónica y colecistitis aguda y crónica. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas al hígado o la vesícula biliar incluyen, sin limitación, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis vírica (por ejemplo, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, mononucleosis, rubeola, virus de Epstein-Barr y citomegalovirus), otras causas hepatitis tales como infección bacteriana grave, infecciones amebianas, medicamentos (por ejemplo, agomelatina, alopurinol, amitriptilina, amiodarona, asatioprina, paracetamol, halotano, ibuprofeno, indometacina, isoniácida, rifampicina, piracinamida, ketoconazol, loratadina, metotrexato, metildopa, minociclina, nifedipina, nitrofurantoína, fenitoína, ácido valproico, troglitazona, zidovudina), toxinas (por ejemplo, alcohol, toxinas fúngicas) y trastornos metabólicos (por ejemplo, enfermedad de Wilson, un trastorno del metabolismo del cobre en el organismo, hemocromatosis, trastorno del metabolismo del hierro en el organismo, esteatohepatitis no alcohólica, deficiencia de alfa 1 -antitripsina). Los ejemplos adicionales incluyen enfermedad de hígado graso no alcohólico, cirrosis tal como cirrosis biliar primaria, ictericia obstructiva, hepatitis isquémica y enfermedad de la vesícula biliar.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la reducción de respuestas y afecciones inflamatorias asociadas con el sistema linfático/inmunitario. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el sistema linfático/inmunitario incluyen, sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, tales como enfermedad de Chagas, trastorno pulmonar obstructivo crónico (EPOC), enfermedad de Crohn, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo I, endometriosis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, hidradenitis supurativa, enfermedad de Kawasaki, nefropatía IgA, púrpura trombocitopénica (idiopática), cistitis intersticial, lupus eritematoso, enfermedad del tejido conjuntivo mixta, morfea, miastenia grave, narcolepsia, neuromiotonía, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, psoriasis, artritis psoriásica, polimiositis, cirrosis biliar primaria, artritis reumatoide, esquizofrenia, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida, arteritis temporal, colitis ulcerosa, vitiligo y granulomatosis de Wegener, además de anemia hemolítica autoinmunitaria y diversas linfadenopatías.

Se incluyen también afecciones inflamatorias relacionadas con el sistema inmunitario asociadas con el trasplante de un injerto, tejido, célula u órgano, tal como rechazo del injerto, rechazo del injerto crónico, rechazo del injerto subagudo, rechazo del injerto hiperagudo, rechazo del injerto agudo y enfermedad del injerto contra el hospedador. En algunas realizaciones de la presente descripción, pueden administrarse polipéptidos AARS a un donante de trasplante antes o durante la extracción del tejido. En algunas realizaciones de la presente descripción, pueden administrarse polipéptidos de HRS al receptor de un trasplante antes, durante y/o después de la terapia del trasplante para reducir las complicaciones relacionadas con la inflamación de la terapia del trasplante. Los ejemplos de terapias de trasplante incluyen médula ósea, células madre, sangre periférica, hígado, pulmón, corazón, piel y riñón, entre otros conocidos en la técnica. Los ejemplos adicionales incluyen afecciones inflamatorias asociadas con alergias, tales como asma, habones, urticaria, alergia al polen, alergia a los ácaros del polvo, alergia a los venenos, alergia a los cosméticos, alergia al látex, alergia química, alergia farmacológica, alergia a la picadura de insectos, alergia a la caspa animal, alergia a las plantas urticantes, alergia a la hiedra venenosa y alergia alimentaria.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la reducción de respuestas y afecciones inflamatorias asociadas con el sistema urogenital. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el sistema urogenital incluyen, sin limitación, inflamaciones, infecciones o cánceres de uréter, vejiga, uretra, cuello del útero, trompas de Falopio, ovarios, útero, matriz, vulva, próstata, glándulas bulbouretrales, epidídimo, próstata, vesículas seminales, testículos o riñones. Se incluyen también nefritis intersticial autoinmunitaria, absceso renal (intrarrenal o extrarrenal), prostatitis aguda, hematuria, uretritis (por ejemplo, por Chlamydia y otras enfermedades de transmisión sexual), enfermedad pélvica inflamatoria (EPI) y absceso prostático. Se incluye también nefritis asociada con uno o más de entre glomerulonefritis, lupus nefritis, nefropatía, gota, venenos o sustancias químicas (por ejemplo, éter, sulfato de talio), algunos medicamentos (por ejemplo, piroxicam, candil, gel de feldeno, fensaid, pirox), síndrome de Herrmann, fiebre amarilla, enfermedades complejas inmunitarias, fiebre tifoidea, estenosis uretral, tuberculosis renal y glomerulonefritis postestreptocócica.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la reducción de respuestas y afecciones inflamatorias asociadas con el sistema musculoesquelético. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el sistema musculoesquelético incluyen, sin limitación, artritis tales como artritis reumatoide y artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, miositis autoinmunitaria, síndrome de Sjögren primario, enfermedad autoinmunitaria de los músculos lisos, miositis, polimiositis, tendinitis, inflamación de los ligamentos, inflamación de los cartílagos, inflamación de las articulaciones, inflamación sinovial, síndrome de túnel carpiano, inflamación crónica muscular e inflamación ósea, que incluye inflamación ósea asociada con osteoporosis y artrosis. Se incluyen también síndrome de Tietze, una tumefacción benigna, dolorosa, no supurativa y localizada de las articulaciones costoesternal, esternoclavicular o costocondral, costocondritis, síndrome esternal, xifoidalgia, subluxación esternoclavicular espontánea, hiperostosis esternocostoclavicular, fibromialgia, tendinitis o bursitis del hombro, artritis gotosa, polimialgia reumática, lupus eritematoso, espolones óseos, fracturas tales como fracturas por estrés, caquexia, sarcopenia, debilidad muscular, enfermedad por degeneración muscular, lesión muscular, mialgia, miopatía de cuerpos de inclusión esporádica, miopatía por cuerpos de inclusión hereditaria y deficiencia de sarcoglucano. Se incluyen también distrofias musculares (por ejemplo, DMD), distrofias miotónicas, rabdomiólisis y otras enfermedades inflamatorias musculares descritas en la presente memoria.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la reducción de respuestas y afecciones inflamatorias asociadas con el sistema endocrino. Los ejemplos de afecciones inflamatorias asociadas con el sistema endocrino incluyen, sin limitación, inflamación, infección o cáncer asociados con el hipotálamo, la hipófisis, el tiroides, el páncreas o las glándulas suprarrenales, enfermedades glandulares tales como enfermedad pancreática, diabetes tales como diabetes tipo I, enfermedad tiroidea, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmunitaria espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema (idiopático), autoinmunidad ovárica, infertilidad antiespermatozoides autoinmunitaria, prostatitis autoinmunitaria y síndrome poliglandular autoinmunitario tipo I.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a la reducción de respuestas y afecciones inflamatorias asociadas con tejidos adiposos, un participante activo en la regulación de los procesos fisiológicos y patológicos, que incluye inflamación inmunitaria, así como estados inflamatorios asociados con lipodistrofias, laminopatías, enfermedad de Kawasaki, artritis idiopática juvenil, enfermedades del almacenamiento de lisosomas y mucopolisacaridosis.

Los macrófagos son componentes de tejido adiposo y participan activamente en sus actividades. Además, la relación cruzada entre linfocitos y adipocitos puede conducir a una regulación inmunitaria. El tejido adiposo produce y libera diversos factores proinflamatorios y antiinflamatorios, que incluyen las adipocinas leptina, adiponectina, resistina y visfatina, así como citocinas y quimiocinas, tales como TNF-alfa, IL-6, proteína quimioatrayente de monocitos 1 y otras. Las moléculas proinflamatorias producidas por tejido adiposo se han implicado como participantes activos en el desarrollo de resistencia a la insulina y el aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares asociadas con la obesidad. En cambio, los niveles reducidos de leptina pueden predisponer a un aumento de la susceptibilidad a la infección causado por respuestas reducidas de linfocitos T en personas con malnutrición. Se han observado niveles alterados de adipocinas en diversas afecciones inflamatorias (véase, por ejemplo, Fantuzzi, *J Allergy Clin Immunol.* 115:911-19, 2005; y Berg y col., *Circulation Research.* 96:939, 2005).

Los polipéptidos de HRS también pueden emplearse para tratar o manejar inflamación asociada con hipersensibilidad. Los ejemplos de dichas afecciones incluyen hipersensibilidad tipo I, hipersensibilidad tipo II, hipersensibilidad tipo III, hipersensibilidad tipo IV, hipersensibilidad inmediata, hipersensibilidad mediada por anticuerpos, hipersensibilidad mediada por complejo inmunitario, hipersensibilidad mediada por linfocitos T e hipersensibilidad de tipo retardado.

Los polipéptidos de HRS pueden emplearse también para tratar o manejar afecciones autoinflamatorias. Los ejemplos de afecciones autoinflamatorias incluyen fiebre mediterránea familiar, síndrome periódico asociado a receptor TNF (TRAPS), síndrome hiper-IgD (HIDS), enfermedades relacionadas con CIASI tales como síndrome de Muckle-Wells, síndrome autoinflamatorio frío familiar y enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal, síndrome PAPA (artritis estéril piógena, pioderma gangrenoso, acné) y síndrome de Blau.

Los polipéptidos de HRS pueden emplearse para tratar o manejar inflamación asociada con diversos cánceres. Los ejemplos de dichos cánceres incluyen, sin limitación, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer testicular, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer cerebral, melanoma, cáncer de piel no de melanoma, cáncer de huesos, linfoma, leucemia, cáncer de tiroides, cáncer de endometrio, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, neuroblastoma, glioblastoma y linfoma no hodgkiniano.

Tal como se indica anteriormente, algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear polipéptidos de HRS para modular la inflamación sistémica, por ejemplo para reducir o tratar la inflamación sistémica. En algunas realizaciones de la presente descripción, la inflamación sistémica puede asociarse con el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), una afección inflamatoria de todo el cuerpo con diversas causas potenciales. El SRIS puede caracterizarse o identificarse de acuerdo con técnicas diagnósticas rutinarias. A modo de ejemplo no limitativo, el SRIS puede identificarse por la presencia de dos o más de entre los siguientes aspectos: (i) una temperatura corporal que es inferior a 36°C o superior a 38°C, (ii) una frecuencia cardíaca que es superior a 90 latidos por minuto, (iii) taquipnea (frecuencia respiratoria alta), con más de 20 respiraciones por minuto; o una presión parcial arterial de dióxido de carbono inferior a 4,3 kPa (32 mmHg), y (iv) recuento leucocitario inferior a 4.000 células/mm³ (4 x 10⁹ células/L) o superior a 12.000 células/mm³ (12 x 10⁹ células/L); o la presencia de más del 10% de neutrófilos inmaduros (formas de banda).

El SRIS se clasifica en sentido extenso como infeccioso o no infeccioso. En sentido muy general, el SRIS infeccioso se asocia con sepsis, un estado inflamatorio de todo el organismo combinado con una infección conocida o sospechada, que incluye bacteriemia, viremia, parasitemia y síndrome de shock tóxico. La sepsis puede asociarse con una amplia variedad de agentes infecciosos, que incluyen, sin limitación, bacterias tales como *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* negativo a la coagulasa, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella species*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*, *S. agalactiae*, *Serratia species*, *Acinetobacter species*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella species* y *Neisseria meningitidis*; virus tales como rubeola, citomegalovirus, herpes simple y virus de la varicela; parásitos tales como los de la infección palúdica (por ejemplo, *Plasmodium falciparum*), tripanosomiasis y filariasis; y hongos tales como *Candida species*, *Aspergillus species*, *Histoplasma species*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* y *Pneumocystis carinii*. En algunos casos, las infecciones en los pulmones (por ejemplo, neumonía), la vejiga y los riñones (por ejemplo, infecciones de las vías urinarias), la piel (por ejemplo, celulitis), el abdomen (por ejemplo, apendicitis) y otras zonas (por ejemplo, meningitis) pueden difundirse y producir sepsis. Los

polipéptidos de HRS pueden usarse para modular la inflamación asociada con cualquiera de estos agentes infecciosos, ya esté presente la sepsis o no.

- El SRIS no infeccioso puede asociarse con traumatismo, quemaduras, pancreatitis, isquemia, hemorragia, complicaciones quirúrgicas, insuficiencia suprarrenal, embolia pulmonar, aneurisma aórtico, taponamiento cardíaco, anafilaxis y sobredosis de fármacos, entre otros. El SRIS se complica a menudo por el fallo de uno o más órganos o sistemas orgánicos, que incluyen los descritos en la presente memoria. Los ejemplos específicos incluyen lesión pulmonar aguda, lesión renal aguda, shock y síndrome de disfunción multiorgánica, entre otros. Normalmente, el SRIS se trata centrándose en el problema subyacente (por ejemplo, reposición de líquidos adecuada para hipovolemia, IVF/NPO para pancreatitis, epinefrina/esteroides/benadril para anafilaxis). En algunos casos, el selenio, la glutamina y el ácido eicosapentanoico han mostrado efectividad en la mejoría de los síntomas de SRIS, y antioxidantes como la vitamina E también pueden ser de utilidad. Por ello, los polipéptidos de HRS pueden usarse para tratar o manejar el SRIS y las complicaciones de SRIS, en solitario o en combinación con otras terapias.
- 15 La inflamación sistémica también puede asociarse con una "tormenta de citocinas", una peligrosa reacción inmunitaria causada por un bucle de retroalimentación positivo entre citocinas y células inmunitarias, que produce niveles muy elevados de diversas citocinas. En algunos casos, la tormenta de citocinas (hipercitocinemia) incluye la liberación sistémica de numerosos mediadores inflamatorios conocidos tales como citocinas, radicales libres de oxígeno y factores de coagulación). Se incluyen niveles elevados de citocinas proinflamatorias tales como TNF-alfa, IL-1 e IL-6, y citocinas antiinflamatorias tales como antagonistas de receptores de IL-10 e IL-1. Las tormentas de citocinas pueden producirse en diversas enfermedades infecciosas y no infecciosas que incluyen enfermedad del injerto contra el hospedador (EICH), síndrome agudo de distrés respiratorio (SADR), sepsis, gripe aviar, varicela y SRIS. La tormenta de citocinas puede ser inducida también por ciertos medicamentos. El tratamiento incluye OX40 IG, que reduce las respuestas de los linfocitos T, los inhibidores ACE, los bloqueantes de los receptores de angiotensina II, los corticoesteroides, el genfibrocilo, materiales trampa de radicales libres y bloqueantes TNF-a. Por consiguiente, los polipéptidos de HRS pueden emplearse para tratar o manejar tormentas de citocinas, en solitario o en combinación con otras terapias.

- Algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear polipéptidos de HRS para reducir uno cualquiera o más de entre inflamación granulomatosa, inflamación fibrinosa, inflamación purulenta, inflamación serosa o inflamación ulcerosa. La inflamación granulomatosa se caracteriza por la formación de granulomas, normalmente resultantes de una respuesta a agentes infecciosos tales como tuberculosis, lepra y sífilis. La inflamación fibrinosa procede de un aumento importante en la permeabilidad vascular, que permite el paso de la fibrina a través de los vasos sanguíneos. Si existe un estímulo procoagulador apropiado, tal como una célula cancerosa, se deposita un exudado fibrinoso. Este proceso se observa comúnmente en las cavidades serosas, donde la conversión de exudado fibrinoso en una cicatriz puede producirse entre las membranas serosas, lo que limita su función. La inflamación purulenta procede de la formación de una gran cantidad de pus, que consiste en neutrófilos, células muertas y fluidos. La infección por bacterias piógenas tales como estafilococos es característica de esta clase de inflamación. Las acumulaciones grandes y localizadas de pus confinadas por tejidos circundantes reciben el nombre de abscesos. La inflamación serosa se caracteriza por la efusión abundante de un líquido seroso no viscoso, producido comúnmente por células mesoteliales de membranas serosas, pero también puede proceder de plasma sanguíneo. Los ejemplos de este tipo de inflamación incluyen ampollas en la piel. La inflamación ulcerosa, que normalmente se produce cerca de un epitelio, produce la pérdida necrótica de tejido de la superficie, con lo que deja expuestas las capas inferiores de tejido. La ulterior excavación del epitelio se conoce como úlcera.

- Los polipéptidos de HRS también pueden emplearse en el tratamiento de lesiones físicas o heridas. Los ejemplos abrasiones, hematomas, cortes, heridas cortantes, laceraciones, heridas por impacto, conmociones, contusiones, quemaduras térmica, congelaciones, quemaduras químicas, quemaduras solares, gangrena, necrosis, desecaciones, quemaduras por radiación, quemaduras por radioactividad, inhalación de humos, músculos desgarrados, músculos lesionados por tracción, tendones rotos, tendones lesionados por tracción, ligamentos lesionados por tracción, ligamentos rotos, hiperextensiones, cartílago roto, fracturas óseas, pinzamiento de nervios, úlceras y heridas por arma de fuego u otras traumáticas.

- Los polipéptidos de HRS también pueden emplearse para tratar o manejar inflamación idiopática o inflamación de etiología desconocida. Se incluyen también terapias de combinación, en las que se administran uno o más polipéptidos AARS o se utilizan en combinación con una o más de otras terapias para cualquiera de las enfermedades o afecciones inflamatorias descritas en la presente memoria, que incluyen aquellas terapias que están disponibles comúnmente y son conocidas en la técnica. Los ejemplos de terapias de combinación incluyen el uso de agentes antiinflamatorios estándar tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), derivados antiinflamatorios selectivos inmunitarios (AINEIm) y esteroides (por ejemplo, corticoesteroides), antiinfecciosos tales como antibióticos y agentes antivíricos, antioxidantes, citocinas, agentes quimioterapéuticos y otras terapias

anticancerosas, y terapias inmunosupresoras.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la presente descripción se refiere en general a procedimientos y composiciones para facilitar la eliminación extracorpórea de anticuerpos endógenos usando polipéptidos de HRS unidos a un soporte sólido biocompatible.

La eliminación específica de anticuerpos circulantes por inmunoadsorción extracorpórea que emplean un antígeno inmovilizado ha sido descrita por varios investigadores. Véase en general Köhler y col., (2011) J Clin Apher. (6):347-55; Müller y col., (2012) Dermatology; 224(3):224-7; Koziolok y col., (2012) J Neuroinflammation. 9(1):80; Bontadi y col., (2012) J Clin Apher. doi: 10.1002/jca.21229; Westermann y col., (2012) J Dermatol. 39(2):168-71. Por otra parte este enfoque se ha comercializado con éxito como un sistema viable para eliminar específicamente anticuerpos circulantes, tal como se ilustra mediante columnas de inmunoadsorción comercializadas con los nombres de marca Prosorba®, Immunosorba®, comercializada por Fresenius, St. Wendel, Alemania, y Selesorb® comercializada por Kaneka, Wiesbaden, Alemania.

En inmunoadsorción extracorpórea, los anticuerpos circulantes son eliminados de forma extracorpórea usando una columna inmunoadsorbente específica para el anticuerpo endógeno. La sangre del paciente es extraída de forma continua o discontinua, separada en sus componentes celulares y en plasma, y el plasma se perfunde a través del material inmunoadsorbente para eliminar el anticuerpo. El plasma y los componentes celulares tratados de la sangre se reinfunden a continuación en el paciente, de forma separada o simultánea. En algunas realizaciones de la presente descripción, la inmunoadsorción extracorpórea de acuerdo con la presente descripción puede realizarse inmediatamente antes de la administración de un polipéptido de HRS.

Por consiguiente algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a procedimientos para inmunoadsorción extracorpórea de anticuerpos anti-histidil-tRNA sintetasa a partir de un fluido corporal extracelular, que comprende las etapas de: (a) suministro del fluido corporal extracelular que se ha obtenido de un sujeto, (b) puesta en contacto del fluido corporal extracelular con un soporte sólido biocompatible que tiene al menos un polipéptido de HRS unido al mismo, capturando así los anticuerpos anti-HRS, y (c) reinfusión del fluido corporal extracelular de la etapa (b) en el sujeto.

Se incluyen también composiciones inmunoadsorbentes destinadas a su uso en la eliminación de los anticuerpos anti-HRS del fluido corporal de un sujeto, que comprende un soporte sólido biocompatible que tiene al menos un polipéptido de HRS unido al mismo.

En general, en cualquiera de estos procedimientos y composiciones inmunoadsorbentes, los fluidos corporales se obtienen, manejan y reinfunden en condiciones asépticas usando procedimientos y sistemas que son bien conocidos para un experto en la materia. Por ejemplo, la sangre se extrae por medio de una aguja que se introduce, por ejemplo, en una vena periférica conectada por medio de un tubo adecuado al recipiente que contiene el soporte sólido biocompatible y se reinfunde en el paciente por medio de un tubo de entrada conectado con una aguja introducida en otra vena. En situaciones donde deben extraerse grandes volúmenes del sujeto, la sangre puede extraerse, por ejemplo, de la vena subclavia.

La sangre o el plasma se pondrán en contacto con el soporte sólido biocompatible en condiciones que favorecen la unión entre los anticuerpos y los polipéptidos de HRS unidos al soporte. Se dispone de columnas y sistemas de perfusión adecuados para adsorción extracorpórea comercializados, por ejemplo por Fresenius, St. Wendel, Alemania. Normalmente se usan temperaturas de contacto en el intervalo de 35°C a aproximadamente 40°C. El tiempo de contacto estará en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 horas. A continuación se recoge la parte no unida de la sangre o el plasma para su reintroducción en el paciente o bien puede reintroducirse directamente de manera continua. La valoración de anticuerpos Jo-1 del sujeto puede supervisarse a continuación mediante inmunoensayo antes y/o después del procedimiento para supervisar la eficiencia del procedimiento.

Opcionalmente, a la sangre puede añadirse una sustancia de anticoagulación tal como citrato de sodio, heparina o dextrano cuando se extrae del cuerpo con el fin de prevenir la coagulación de la sangre. El dextrano reduce la viscosidad de la sangre y, en combinación con la adición de solución salina, asegura un aumento de la distancia entre las células de la sangre y las plaquetas de la sangre. Dichos anticoagulantes pueden añadirse en cantidades suficientes para la no coagulación de la sangre. Antes de reinfundir la sangre tratada en el sujeto puede reducirse el efecto de anticoagulación, por ejemplo, de la heparina con la cantidad apropiada de heparinasa, protamina y/o vitamina K, etc.

Para reducir el riesgo de embolia, pueden adoptarse precauciones para evitar que las partículas del medio de adsorción entren en el paciente con la reinfusión. Por consiguiente normalmente se emplea un dispositivo de captura

de partículas en sentido descendente con respecto al recipiente del medio de adsorción para eliminar cualquier partícula residual del resto del fluido corporal antes de su devolución al paciente. El dispositivo de captura de partículas puede ser un filtro o una malla que tiene aberturas de un tamaño tal que retiene cualquier material de partículas del medio de adsorción mientras que deja pasar a su través las entidades adsorbidas del fluido corporal.

- 5 La perfusión de sangre extracorpórea puede realizarse de manera continua, o alternativamente, pueden extraerse volúmenes discretos de sangre del paciente, tratarse tal como se describe anteriormente y devolver el plasma y los componentes celulares de la sangre tratados al paciente después de completar el tratamiento.

- Como soportes sólidos biocompatibles será adecuada una amplia variedad de materiales, destinados a su uso en cualquiera de estos procedimientos y composiciones inmunoabsorbentes, e idealmente, la matriz de soporte será mecánicamente fuerte, suficientemente hidrófila para evitar la unión no específica de proteínas, estable y compatible con la sangre y otras soluciones acuosas. Los materiales de matrices biocompatibles adecuados incluyen, por ejemplo, polímeros naturales y sintéticos, polisacáridos, poliamidas, perlas de vidrio, sílice en partículas, vidrio poroso, sílice, resinas, matrices sintéticas que incluyen derivados de acrilamida, derivados de metacrilamida o derivados de poliestireno, etc., en diversas formas que incluyen perlas, forma fibrosa, láminas o fibras huecas.

- Los polímeros de ejemplo incluyen polisacáridos naturales y sintéticos y otros polímeros basados en hidratos de carbono, que incluyen agar, alginato, carragenano, goma guar, goma arábica, goma ghatti, goma de tragacanto, goma de karaya, goma garrofín, goma de xantano, agarosas, celulosas, pectinas, mucinas, dextranos, almidones, heparinas, quitosanos, hidroxialmidones, hidroxipropilalmidones, carboximetilalmidones, hidroxietilcelulosas, hidroxipropilcelulosas y carboximetilcelulosas. Los polímeros y monómeros orgánicos sintéticos que producen polímeros incluyen polímeros acrílicos, poliamidas, poliimidas, poliésteres, poliéteres, compuestos poliméricos de vinilo, polialquenos y derivados sustituidos de los mismos, así como copolímeros que comprenden más de una de estas funcionalidades de polímeros, y derivados sustituidos de los mismos; y mezclas de los mismos.

- En cualquiera de estos procedimientos y composiciones extracorpóreas, los polipéptidos de HRS están normalmente unidos por enlaces covalentes al soporte sólido biocompatible, y los procedimientos estándar para acoplar proteínas tales como los polipéptidos de HRS son bien conocidos para los expertos en la materia (véase, por ejemplo Affinity Chromatography, Principles and Methods (Pharmacia-LKB), Dean, P.G., y col., ed., 1985, Affinity Chromatography: A practical approach, IRL Press, Oxford, y Scouten, W.H., 1981, Affinity Chromatography, Wiley Interscience, Nueva York), "Immobilized Affinity Ligand Techniques" de Hermanson y col., Academic Press, Inc., San Diego, 1992). El soporte sólido biocompatible puede derivatizarse (activarse) para formar una sustancia reactiva que puede reaccionar con uno o más grupos químicos funcionales en el polipéptido de HRS, formando así un enlace químico covalente para acoplar el polipéptido de HRS al soporte sólido biocompatible. Así, los materiales que comprenden grupos hidroxilo, amino, amida, carboxilo o tiol pueden ser activados y derivatizados usando distintas sustancias químicas de activación, por ejemplo, sustancias químicas tales como bromuro de cianógeno, divinilsulfona, epiclorohidrina, bisepoxiranos, dibromopropanol, aldehído glutárico, anhídridos de carbodiimidas, hidracinas, peryodatos, benzoquinonas, triacinas, tosilatos, tresilatos y/o iones de diazonio, etc.

- Los soportes sólidos biocompatibles de ejemplo específicos destinados a su uso en cualquiera de estos procedimientos y composiciones incluyen por ejemplo CNBr-Sefarosa, celulosas, tales como Sefarosa activada por CNBr 4B (Amersham) o agarosa activada por epóxidos (Sigma). Pueden emplearse espaciadores biocompatibles (como, por ejemplo, sefarosa activada por NHS 4 Fast Flow) o sin (como, por ejemplo, sefarosa activada por CNBr 4B) y están disponibles comercialmente, y los procedimientos para acoplar dichos materiales con los polipéptidos de HRS son bien conocidos en la técnica, y pueden optimizarse mediante experimentación rutinaria basada en las instrucciones del fabricante.

- Los polipéptidos de HRS adecuados para su uso en cualquiera de estos procedimientos y composiciones extracorpóreas incluyen cualquiera de los polipéptidos de HRS enumerados en las **Tablas 1-9**, o deducibles de ellas, o en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182, donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo reconocido por un anticuerpo anti-Jo-1. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS se selecciona de entre HRS de longitud completa, HRS(1-506), HRS(2-506) y HRS(1-60).

55 **Polipéptidos derivados de histidil-tRNA sintetasa**

- Las realizaciones de la presente descripción se refieren en general al uso de histidil-tRNA sintetasa derivada de polipéptidos (polipéptidos de HRS), por ejemplo, como agentes antiinflamatorios, agentes inmunorreguladores o de bloqueo de anticuerpos o proteínas de sustitución. Las histidil-tRNA sintetasa pertenecen a la familia de tRNA sintetasa de clase II, que tiene tres motivos de secuencia altamente conservados. Las tRNA sintetasa de clase I y II son ampliamente reconocidas como responsables de la unión específica de un aminoácido a su tRNA

correspondiente en una reacción en 2 etapas: el aminoácido (AA) es activado primero por ATP para formar AA-AMP y a continuación es transferido al extremo aceptor del tRNA. Las histidil-tRNA sintetasas citosólicas de longitud completa existen normalmente como un homodímero citosólico o como una forma mitocondrial con splicing alternativa.

5

Más recientemente se ha establecido que algunos fragmentos biológicos, o alternativamente isoformas de splicing de histidil-tRNA sintetasas eucariotas (fisiocrinas, o polipéptidos de HRS), o en algunos contextos la sintetasa intacta, modulan ciertas vías de señalización celular, o tienen propiedades antiinflamatorias. Estas actividades, que son distintas del papel clásico de las tRNA sintetasas en síntesis de proteínas, se denominan colectivamente en la presente memoria "actividades no canónicas". Estas fisiocrinas pueden producirse naturalmente mediante splicing o proteólisis alternativa, y pueden actuar en una forma autónoma en la célula (es decir, dentro de la célula hospedadora) o en una forma autónoma no en la célula (es decir, fuera de la célula hospedadora) para regular una diversidad de mecanismos homeostáticos. Por ejemplo, tal como se indica en la presente descripción, los polipéptidos de HRS tales como el fragmento en el extremo N de histidil-tRNA sintetasa (por ejemplo, HRS(1-48), HRS(1-60)) son capaces, entre otros, de ejercer una señal antiinflamatoria mediante el bloqueo de la migración de células inflamatorias a los sitios de inflamación activa *in vivo*. Además, algunas mutaciones o deleciones (por ejemplo, HRS(1-506)) con respecto a la secuencia de polipéptidos de HRS de longitud completa confieren el aumento de actividades y/o mejora de las propiedades farmacológicas, la estabilidad y/ o la homogeneidad en comparación con la histidil-tRNA sintetasa de tipo no mutado. En la **Tabla D1** se proporcionan las secuencias de algunos polipéptidos de HRS de ejemplo.

Tabla D1			
Polipéptidos de HRS de ejemplo			
Nombre	Tipo/especie/residuos	Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos	SEQ ID NO:
Fisiocrinas en el extremo N			
Tipo no mutado citosólico de longitud completa	Proteína/ Humana/	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LK AQLGPDESKQKFV LKTPKGTRDYS PRQMAVREKVF DVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLR YDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYR	1
		EFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVND RRILDMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEVKNEVMVG EKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALE GLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLL QTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPVGL SIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVLVASAQKKLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQE LKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	
Tipo no mutado mitocondrial de longitud completa	Proteína/ Humana/	MPLLGLLPRAWASLLSQLLRPPCASC TGAVRCQSQVAEAVL TSQ LKAHQEKPNFIKTPKGTRDLSPQH MVVREKILD LVISCFK RHGAKGMDTPAFELKETLTEKYGEDSGLMYDLKDQGGELLS LRYDLTVPFARYLAMNKVKMKRYHVGVWRRESPTIVQGR YREFCQCDFDIAGQFDPMPDAECLKIMCEILSGLQLGDFLIKV NDRRIVDGMFAVCGVPESKFRAICSSIDKLDKMAWKDVRHE MVVKKGLAPEVADRIGDYVQCHGGVSLVEQMFQDPRLSQNK QALEGLDLKLLFEYLT LFGIADKISFDLSLARGLDYYTGVIYE AVLLQTPTQAGEEPLNVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGHKVP CVGLSIGVERIFYIVEQRMKTKGEKVRTTETQVFVATPQKNFL QERLKLIAELWDSGIKAEMLYKNNPKLLTQLHYCESTGIPLVV IIGEOELKEGVKIRSVASREEVAIKRENFVAEIQRLSES	39
HisRS1 ^{N1}	Proteína/ Humana/1-141	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LK AQLGPDESKQKFV LKTPKGTRDYS PRQMAVREKVF DVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLR YDLTVPFARYLAM	2

HisRS1 ^{N2}	Proteína/ Humana/1-408	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVF DVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLR YDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYR EFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVND RRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALE GLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLDYYTGV IYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGL SIGVERIFSIVEORLEALEEKIRTTE	3
HisRS1 ^{N3}	Proteína/ Humana/1-113	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVF DVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKL	4
HisRS1 ^{N4} (Resokine ; SV9; HRS(I-60))	Proteína/ Humana/1-60	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LK AQLGPDESKQKFVLKTPK	5
HisRS1 ^{N5}	Proteína/ Humana/1-243 + 27aa	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVF DVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLR YDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYR EFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVND RRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVGYPWWNSC SRIL NYPKTSRPRAWET	6
Fisiocrinas en el extremo C			
Nombre	Tipo/especie/ residuos	Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos	SEQ ID NO:
HisRS1 ^{C1}	Proteína/ Humana/405-509	RTTETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNP KLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVR REDLVEEIKRRTGOPLCIC	7
HisRS1 ^{C2}	Proteína/ Humana/1-60 + 175-509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LK AQLGPDESKQKFVLKTPKDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDK VSWEEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLL ODPKLSONKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARG LDYYTGV IYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGOPLCIC	8
HisRS1 ^{C3}	Proteína/ Humana/1-60 + 211-509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LK AQLGPDESKQKFVLKTPKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTIC SSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGG VSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISF DLSLARGLDYYTGV IYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGR YDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKL LNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGOPLCIC	9
HisRS1 ^{C4}	Proteína/ Humana/1-100 + 211-509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVF DVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVD KLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLV EQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSL ARGLDYYTGV IYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDG LVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TET QVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQ LQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLV EIKRRTGOPLCIC	10

HisRS1 ^{C5}	Proteína/ Humana/1- 174 + 211-509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGT RDYSPRQMAVREKVF DVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELSLR YDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYR EFYQCVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE E VKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKL SQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYYT GVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPK GRKVP CVLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVL VASAQ KKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAG IPLVAIIGEQELKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTG OPLCIC	11
HisRS1 ^{C6}	Proteína/ Humana/1-60 + 101-509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGEL LSLR YDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRG RYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVK VNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNE MVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNK QALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGV IYE AVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVP CVLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVL VASAQKKLLEE RLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI GEOELKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGOPLCIC	12
HisRS1 ^{C7}	Proteína/ Humana/1- 100 + 175-509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGT RDYSPRQMAVREKVF DVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQI GDFLVKNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPK LSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYY TGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDP KGRKVP CVLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVL VASA QKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAG IPLVAIIGEQELKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GOPLCIC	13
HisRS1 ^{C8}	Proteína/ Humana/ 1-60 + 399- 509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKALEEKIRT TETQVL VASAQKKLLEE RLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI GEOELKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGOPLCIC	14
HisRS1 ^{C9}	Proteína /Humana/1- 100 + 399-509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGT RDYSPRQMAVREKVF DVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKALEEKIRT TETQVL VASAQKKLLEERLK LVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQ ELKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGOPLCIC	15
HisRS1 ^{C10}	Proteína/ Humana/369- 509	MFDPKGRKVP CVLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQY CEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEE IKRRTGOPLCIC	16
Fisiocinas internas			
Nombre	Tipo/especie/ residuos	Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos	SEQ ID NO:
HisRS1 ¹	Proteína/ Humana/191-333	CLKIMCEILSSLQIGDFLVKNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTI CSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQH GGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDD KISFDLSLARGLDYYTG	17

Se ha secuenciado una serie de polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP9 de la histidil-tRNA sintetasa de origen natural y variantes de origen natural del gen humano, y en la técnica se sabe que son al menos parcialmente intercambiables funcionalmente. Varias de estas variantes de histidil-tRNA sintetasa (es decir, SNP de histidil-tRNA 5 sintetasa representativos) se muestran en la **Tabla D2**.

Tabla D2			
SNP de Histidil-tRNA sintetasa humana			
Número de acceso Gene Bank	Cambio de nucleótidos	Número de acceso Gene Bank	Cambio de nucleótidos
rs193103291	A/G	rs186312047	A/G
rs192923161	C/T	rs186176857	C/T
rs192784934	A/G	rs186043734	C/G
rs192164884	A/G	rs185867584	C/T
rs192090865	A/C	rs185828130	A/G
rs192015101	A/T	rs185537686	A/G
rs191999492	A/G	rs185440931	C/T
rs191852363	C/T	rs185100584	A/C
rs191532032	A/T	rs185077558	C/T
rs191391414	C/T	rs184748736	C/G
rs191385862	A/G	rs184591417	C/T
rs191205977	A/G	rs184400035	C/G
rs191104160	A/G	rs184098206	C/T
rs190989313	C/G	rs183982931	C/T
rs190818970	A/T	rs183942045	A/G
rs190476138	C/T	rs183854085	A/G
rs190289555	C/T	rs183430882	G/T
rs190065567	A/G	rs183419967	A/C
rs189624055	C/T	rs183366286	A/G
rs189563577	G/T	rs183084050	C/T
rs189404434	A/G	rs182948878	C/T
rs189268935	A/G	rs182813126	A/G
rs189103453	A/T	rs182498374	A/G
rs188839103	A/G	rs182161259	A/T
rs188766717	A/G	rs182119902	C/T
rs188705391	A/G	rs182106891	C/T
rs188490030	A/G	rs181930530	A/G
rs188345926	C/T	rs181819577	A/G
rs188174426	A/G	rs181706697	C/T
rs187897435	C/T	rs181400061	G/T
rs187880261	A/G	rs181240610	G/T
rs187729939	G/T	rs181150977	A/C
rs187617985	A/T	rs180848617	A/G
rs187344319	C/T	rs180765564	A/G
rs187136933	C/T	rs151330569	C/G
rs186823043	C/G	rs151258227	C/T
rs186764765	C/T	rs151174822	C/T
rs186663247	A/G	rs150874684	C/T
rs186526524	A/G	rs150589670	A/G
rs150274370	C/T	rs145059663	C/T
rs150090766	A/G	rs144588417	C/T
rs149977222	A/G	rs144457474	A/G
rs149821411	C/T	rs144322728	C/T
rs149542384	A/G	rs143897456	-/C
rs149336018	C/G	rs143569397	G/T
rs149283940	C/T	rs143476664	C/T
rs149259830	C/T	rs143473232	C/G
rs149241235	C/T	rs143436373	G/T
rs149018062	C/T	rs143166254	A/G
rs148935291	C/T	rs143011702	C/G
rs148921342	-/A	rs142994969	A/G
rs148614030	C/T	rs142880704	A/G
rs148584540	C/T	rs142630342	A/G
rs148532075	A/C	rs142522782	-/AAAC
rs148516171	C/T	rs142443502	C/T
rs148394305	-/AAT	rs142305093	C/T

ES 2 652 136 T3

rs148267541	C/T	rs142289599	A/G
rs148213958	C/T	rs142088963	A/C
rs147637634	A/G	rs141765732	A/C
rs147372931	A/C/G	rs141386881	A/T
rs147350096	A/C	rs141291994	A/G
rs147288996	C/T	rs141285041	C/T
rs147194882	G/T	rs141220649	C/T
rs147185134	C/T	rs141147961	-/C
rs147172925	A/G	rs141123446	-/A
rs147011612	C/T	rs140516034	A/G
rs147001782	A/G	rs140169815	C/T
rs146922029	C/T	rs140005970	G/T
rs146835587	A/G	rs139699964	C/T
rs146820726	C/T	rs139555499	A/G
rs146801682	C/T	rs139447495	C/T
rs146571500	G/T	rs139364834	-/A
rs146560255	C/T	rs139362540	A/G
rs146205151	-/A	rs139300653	-/A
rs146159952	A/G	rs139251223	A/G
rs145532449	C/G	rs139145072	A/G
rs145446993	A/G	rs138612783	A/G
rs145112012	G/T	rs138582560	A/G
rs138414368	A/G	rs111863295	C/T
rs138377835	A/G	rs111519226	C/G
rs138300828	C/T	rs111314092	C/T
rs138067637	C/T	rs80074170	A/T
rs138035024	A/G	rs79408883	A/C
rs137973748	C/G	rs78741041	G/T
rs137917558	A/G	rs78677246	A/T
rs117912126	A/T	rs78299006	A/G
rs117579809	G/T	rs78085183	A/T
rs116730458	C/T	rs77844754	C/T
rs116411189	A/C	rs77585983	A/T
rs116339664	C/T	rs77576083	A/G
rs116203404	A/T	rs77154058	G/T
rs115091892	G/T	rs76999025	A/G
rs114970855	A/G	rs76496151	C/T
rs114176478	A/G	rs76471225	G/T
rs113992989	C/T	rs76085408	G/T
rs113720830	C/T	rs75409415	A/G
rs113713558	A/C	rs75397255	C/G
rs113627177	G/T	rs74336073	A/G
rs113489608	A/C	rs73791750	C/T
rs113408729	G/T	rs73791749	A/T
rs113255561	A/G	rs73791748	C/T
rs113249111	C/T	rs73791747	A/T
rs113209109	A/G	rs73273304	C/T
rs113066628	G/T	rs73271596	C/T
rs112967222	C/T	rs73271594	C/T
rs112957918	A/T	rs73271591	A/G
rs112859141	A/G	rs73271586	A/T
rs112769834	C/G	rs73271585	A/G
rs112769758	A/C	rs73271584	A/G
rs112701444	A/C	rs73271581	C/T
rs112585944	A/G	rs73271578	A/T
rs112439761	A/G	rs72800925	G/T
rs112427345	A/C	rs72800924	C/T
rs112265354	C/T	rs72800922	A/T

ES 2 652 136 T3

rs112113896	C/G	rs72432753	-/A
rs112033118	C/T	rs72427948	-/A
rs112029988	A/G	rs72388191	-/A
rs72317985	-/A	rs6873628	C/T
rs71583608	G/T	rs5871749	-/C
rs67251579	-/A	rs4334930	A/T
rs67180750	-/A	rs3887397	A/G
rs63429961	A/T	rs3776130	A/C
rs61093427	C/T	rs3776129	C/T
rs61059042	-/A	rs3776128	A/G
rs60936249	-/AAT	rs3177856	A/C
rs60916571	-/A	rs2563307	A/G
rs59925457	C/T	rs2563306	A/G
rs59702263	-/A	rs2563305	C/T
rs58302597	C/T	rs2563304	A/G
rs57408905	A/T	rs2530242	C/G
rs35790592	A/C	rs2530241	A/G
rs35609344	-/A	rs2530240	A/G
rs35559471	-/A	rs2530239	A/G
rs35217222	-/C	rs2530235	A/C
rs34903998	-/A	rs2230361	C/T
rs34790864	C/G	rs2073512	C/T
rs34732372	C/T	rs1131046	C/T
rs34291233	-/C	rs1131045	C/G
rs34246519	-/T	rs1131044	C/T
rs34176495	-/C	rs1131043	C/G
rs13359823	A/G	rs1131042	A/C
rs13180544	A/C	rs1131041	C/G
rs12653992	A/C	rs1131040	A/G
rs12652092	A/G	rs1131039	C/T
rs11954514	A/C	rs1131038	A/G
rs11745372	C/T	rs1131037	A/G
rs11548125	A/G	rs1131036	A/G
rs11548124	C/G	rs1131035	C/T
rs11344157	-/C	rs1131034	A/G
rs11336085	-/A	rs1131033	A/G
rs11318345	-/A	rs1131032	A/G
rs11309606	-/A	rs1089305	A/G
rs10713463	-/A	rs1089304	A/C
rs7706544	C/T	rs1065342	A/C
rs7701545	A/T	rs1050252	C/T
rs6880190	C/T	rs1050251	A/T
rs1050250	A/G	rs145769024	- /AAACAAAACAAAACA (SEQ ID NO: 154)
rs1050249	C/T	rs10534452	-/AAAAC
rs1050248	A/C/T	rs10534451	-/AAACAAAACA (SEQ ID NO: 155)
rs1050247	C/T	rs59554063	-/CAAAACAAA (SEQ ID NO: 156)
rs1050246	C/G	rs58606188	- /CAAAACAAAACAAA (SEQ ID NO: 157)
rs1050245	C/T	rs71835204	(LARGEDELECIÓN)/-
rs1050222	C/T	rs71766955	(LARGEDELECIÓN)/-
rs813897	A/G	rs144998196	-/AAACAAAACA (SEQ ID NO: 158)
rs812381	C/G	rs68038188	-/ACAAAACAAA (SEQ ID NO: 159)

rs811382	C/T	rs71980275	-/AAAAC
rs801189	C/T	rs71848069	-/AAAC
rs801188	A/C	rs60987104	-/AAAC
rs801187	A/T	rs801185	C/T
rs801186	A/G	rs702396	C/G

Además en otras especies existen homólogos y ortólogos del gen humano, tal como se recoge en la **Tabla D3**, y así sería rutinario seleccionar una variante de aminoácidos o nucleótidos de origen natural en un SNP, u otro homólogo de origen natural en lugar de cualquiera de las secuencias de polipéptidos de HRS humanos enumeradas en las 5 **Tablas D1, D4-D6 o D8**.

Tabla D3		
Homólogos de histidil-tRNA sintetasa humana		
Tipo/especie/ residuos	Secuencias de aminoácidos	SEQ ID NO:
<i>Mus musculus</i>	MADRAALEELVRLQGAHVRLKEQKASAEQIEEEVTKLLKLKAQLGQDE GKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAVIDTPVFEL KETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLRLRYDLTPFARYLAMNKLNIKR YHIKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMPDAECLKIMCEILS SLQIGNFLVKVNDRRILDGMFAVCGVPDSKFRITICSSVDKLDKVSWEVVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQHHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQAVEG LGDLLKLLFEYLLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQMPTQAGE EPLGVGSIAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEAS EEKVRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYWEEAGIPLVAIIGEQLRDGVIKLRVASREEVDVRRREDLVEEIRRR TNQPLSTC	18
<i>Canis lupus familiaris</i>	MAERAALEELVRLQGERVRLKQKASAEQIEEEVAKLLKLKAQLGPDE GKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIISCFKRHGAVIDTPVFEL KETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLRLRYDLTPFARYLAMNKLNIKR YHIKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMPDAECLIMCEILR SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVPSKFRITICSSVDKLDKVSWEVVK EMVGEKGLAPEVADHIGDYVQHHGGISLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLLFGIADKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPVQAGEEP LGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEATE EKVRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLSELWNAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRVASREEVDVPREDLVEEIKRRT SOPFCIC	19
<i>Bos taurus</i>	MADRAALEDLVRVQGERVRLKQKASAEQIEEEVAKLLKLKAQLGPDE GKPKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIISCFKRHGAVIDTPVFELK ETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLRLRYDLTPFARYLAMNKLNIKRY HIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMLPDAECLKIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVPSKFRITICSSVDKLDKVSWEVVK EMVGEKGLAPEVADRIGDYVQHHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLLFGIADKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQPPARAGEEPL GVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEE KVRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLISELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEETGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRVASREEVDVR REDLVEEIKR RTSOPLCIC	20
<i>Rattus norvegicus</i>	MADRAALEELVRLQGAHVRLKEQKASAEQIEEEVTKLLKLKAQLGHDE GKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAVIDTPVFEL KETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLRLRYDLTPFARYLAMNKLNIKR YHIKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMPDAECLKIMCEILS SLQIGNFQVKVNDRRILDGMFAVCGVPDSKFRITICSSVDKLDKVSWEVVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQHHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQAVEG LGDLLKLLFEYLLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQMPTQAGE EPLGVGSIAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEAS EEKVRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLISELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGI PLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVR REDLVEEIRR RTSOPLSM	21
<i>Gallus gallus</i>	MADEAAVRQQAEEVRRRLKQDKAEPDEIAKEVAKLLEMKAHLLGGDEGKH KFVLKTPKGTRDYGPKQMAIRERVFSAIACFKRHGAVIDTPVFELKETL TGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLRLRYDLTPFARYLAMNKITNIKRYHIA KVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMPDAECLKIVQEILSDLQ LGDFLIKVNDRRILDGMFAVCGVPDSKFRITICSSVDKLDKMPWEEVRNEM VGEKGLSPEAADRIGEYVQLHGGMDLIEQLLQDPKLSQNKLVKEGLGDM KLLFEYLLFGITGKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQNDHGEESVSV GSVAGGRYDGLVGMFDPKGR KVPVGLSIGIERIFSILEQRVEASEEKIR TTETQVLVASAQKKLLEERLKLISELWDAGIKAEVLYKKNPKLLNQLQYC EDTGIPLVAIVGEQLKDGVVKL RVVATGEEVNIRRESLVEEIRRTNQL	22

<i>Danio rerio</i>	MAALGLVSMRLCAGLMGRRSAVRLHSLRVCSGMTISQIDEEVARLLQLK AQLGGDEGKHVFLKTAAGTRDYNPKQMAIREKVFNIIINCCKRHAETI DSPVFELKETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSRLYDLTVPFARYLAMN KITNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQYDAMIPDAECL KLVEILSELDLGDFRIKVNDRRILDGMFAICGVPDEKFTICSTVDKLDKL AWEEVKKEMVNEKGLSEEVADRIRDYVSMQGGKDLAERLLQDPKLSQS KQACAGITDMKLLFSYLELFQITDKVVFDSLARGLDYYTGVYIEAILTQA NPAPASTPAEQNGAEDAGVSVGSVAGGGRYDGLVGMFDPKAGKCPVWG SALALRGSSPSWSRRQSCLORRCAPLKLKCLWLQHRRTF	23
--------------------	--	----

Por consiguiente, en cualquiera de los procedimientos, composiciones diagnósticos, composiciones terapéuticas y kits descritos en la presente memoria, los términos "**polipéptido de HRS**", "**proteína de HRS**" o "**fragmento de proteína de HRS**" incluyen todas las formas sintéticas y de origen natural de la histidil-tRNA sintetasa que comprenden al menos un epítipo que experimenta una reacción cruzada específicamente con un autoanticuerpo o un linfocito T autorreactivo de una enfermedad asociada con autoanticuerpos una histidil-tRNA sintetasa, o posee una actividad no canónica. Dichos polipéptidos de HRS incluyen la proteína humana de longitud completa, así como los péptidos HRS derivados de la proteína de longitud completa enumerados en la **Tabla D1**, así como de origen natural, y otras variantes, por ejemplo tal como se describe en o puede deducirse de las **Tablas D2-D9**. En algunas realizaciones de la presente descripción, el término polipéptido de HRS se refiere a una secuencia de polipéptidos derivados de histidil-tRNA sintetasa humana (SEQ ID NO: 1 en la **Tabla D1**) de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS no compite significativamente por autoanticuerpos asociados a la enfermedad que se unen a histidil-tRNA sintetasa de tipo no mutado en un ensayo ELISA competitivo hasta una concentración de aproximadamente $1 \text{ a } 5 \times 10^{-7} \text{ M}$, o superior. Por consiguiente en algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una menor afinidad al autoanticuerpo asociado a la enfermedad que la histidil-tRNA sintetasa de tipo no mutado (SEQ ID NO: 1) tal como se mide en un ensayo ELISA competitivo. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una afinidad aparente por el autoanticuerpo asociado a la enfermedad que es al menos aproximadamente 10 veces menor, o al menos aproximadamente 20 veces menor, o al menos aproximadamente 50 veces menor, o al menos aproximadamente 100 veces menor que la afinidad del autoanticuerpo asociado a la enfermedad humano no mutado (SEQ ID NO: 1).

25 **Polipéptidos de HRS modificados y variantes**

Así todos estos homólogos, ortólogos e isoformas sintéticas o de origen natural de histidil-tRNA sintetasa (por ejemplo, cualquiera de las proteínas o sus ácidos nucleicos correspondientes recogidos en las **Tablas D1-D9** o deducibles a partir de ellas) se incluyen en cualquiera de los procedimientos, kits y composiciones descritos en la presente memoria. En algunos aspectos de la presente descripción, dichos polipéptidos de HRS conservan al menos un epítipo que experimenta una reacción cruzada específicamente con un autoanticuerpo o linfocito T autorreactivo de un sujeto con una enfermedad asociada con autoanticuerpos para histidil-tRNA sintetasa y/o poseen una actividad no canónica. Los polipéptidos de HRS pueden estar en su forma natural, es decir, como diferentes variantes dado que aparecen en la naturaleza en diferentes especies que puede verse como variantes funcionalmente equivalentes de la histidil-tRNA sintetasa humana, o pueden ser derivados naturales funcionalmente equivalentes de las mismas, que pueden diferir en su secuencia de aminoácidos, por ejemplo, por truncamiento (por ejemplo, del extremo N o C o ambos) u otras delecciones, adiciones, inserciones, sustituciones, o modificaciones postraduccionales de aminoácidos. Los derivados químicos de origen natural, que incluyen modificaciones postraduccionales y productos de degradación de cualquier polipéptido de HRS, también se incluyen específicamente en cualquiera de los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria lo que incluye, por ejemplo, variantes de piroglutamilo, isoaspartilo, proteolíticas, fosforiladas, glucosiladas, oxidadas, isomerizadas y desaminadas de un polipéptido de HRS. Los polipéptidos de HRS también pueden estar compuestos por aminoácidos de origen natural y/o aminoácidos de origen no natural, tal como se describe en la presente memoria.

Además de los péptidos que consisten sólo en aminoácidos de origen natural, se proporcionan también peptidomiméticos o análogos de péptidos. Los análogos de péptidos se utilizan normalmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las de los péptidos de plantilla. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos" (Luthman, y col., *A Textbook of Drug Design and Development*, 14:386-406, 2ª ed., Harwood Academic Publishers (1996); Joachim Grante, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 33:1699-1720 (1994); Fauchere, J., *Adv. Drug Res.*, 15:29 (1986); Veber y Freidinger *TINS*, p. 392 (1985); y Evans, y col., *J. Med. Chem.* 30:229 (1987)). Un peptidomimético es una molécula

que emula la actividad biológica de un péptido pero no tiene ya una naturaleza química peptídica. Los compuestos peptidomiméticos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.245.886. En algunas realizaciones de la presente descripción, los polipéptidos de HRS pueden estar compuestos parcial o totalmente por aminoácidos D, por ejemplo, para aumentar la resistencia a la degradación de proteínas *in vivo* (véase, por ejemplo, Wade y col., *PNAS USA*. 87:4761-4765, 1990; Hayry y col., *FASEB Journal*. 9:1336-44, 1995; Van Regenmortel y Muller, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:377-82, 1998; Navab y col., *Circulation*. 105:290-292, 2002; Tugyi y col., *PNAS USA*. 102:412-418, 2005; y la solicitud de EE.UU. nº 2004/00.086.988; véase también Taylor y col., *Biochemistry*. 49:3261-72, 2010; sobre retro-inverso-D-péptidos; y véase también Dedkova y col., *Biochemistry*. 45:15541-51, 2006 sobre ribosomas bacterianos modificados que son capaces de producir proteínas recombinantes con aumento de aminoácidos D).

En la técnica se sabe modificar sintéticamente las secuencias de proteínas o péptidos, mientras se conserva su actividad útil, y esto puede conseguirse usando técnicas que son estándar en la técnica y que se ha descrito ampliamente en la bibliografía, por ejemplo, mutagenia aleatoria o dirigida al sitio, escisión y ligado de ácidos nucleicos, o por medio de la síntesis química o modificación de aminoácidos o cadenas de polipéptidos. De forma similar dentro del alcance de la técnica se encuentra la capacidad de dirigir y/o mitigar los problemas de inmunogenicidad si aparecen usando un polipéptido de HRS o una variante del mismo, por ejemplo, usando programas de reconocimiento informático automatizados para identificar epítomos potenciales de linfocitos T, y enfoques de evolución dirigida para identificar menos formas inmunógenas.

Tal como se indica anteriormente, las realizaciones de la presente descripción incluyen todos los homólogos, ortólogos e isoformas de origen natural de histidil-tRNA sintetasa (por ejemplo, cualquiera de las proteínas recogidas en las **Tablas D1-D9** o deducibles a partir de ellas, o sus ácidos nucleicos correspondientes), y "variantes" de estos polipéptidos de HRS de referencia. El término "variante" de polipéptido se refiere a polipéptidos que se distinguen de un polipéptido de HRS de referencia por la adición, delección y/o sustitución de al menos un residuo de aminoácidos, y que normalmente conservan (por ejemplo, emulan) o modulan (por ejemplo, antagonizan) una o más actividades no canónicas de un polipéptido de HRS de referencia. Las variantes incluyen también polipéptidos que se han modificado mediante la adición, delección y/o sustitución de al menos un residuo de aminoácidos para tener una estabilidad u otras propiedades farmacéuticas mejoradas.

En algunas realizaciones de la presente descripción, una variante de polipéptido se distingue de un polipéptido de referencia por una o más sustituciones, que pueden ser conservadoras o no conservadoras, tal como se describe en la presente memoria y se conoce en la técnica. En algunas realizaciones de la presente descripción, la variante de polipéptido comprende sustituciones conservadoras y, a este respecto, en la técnica es bien conocido que algunos aminoácidos pueden cambiarse por otros con propiedades ampliamente similares sin modificar la naturaleza de la actividad del polipéptido.

Los ejemplos específicos de variantes de polipéptidos de HRS útiles en cualquiera de los procedimientos y composiciones de la presente descripción incluyen polipéptidos de HRS de longitud completa, o truncamientos o variantes de splicing de los mismos (por ejemplo, cualquiera de las proteínas recogidas en las **Tablas D1-D9** o deducibles a partir de ellas) que i) conservan una actividad no canónica detectable y/o conservan al menos un epítipo que experimenta una reacción cruzada específicamente con un autoanticuerpo o linfocito T autorreactivo de un sujeto con una enfermedad asociada con autoanticuerpos para histidil-tRNA sintetasa, y ii) tienen uno o más de entre inserciones, sustituciones, delecciones y/o truncamientos de aminoácidos adicionales. En algunas realizaciones de la presente descripción, una variante de polipéptido incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o más de identidad o semejanza de secuencias con una secuencia correspondiente de un polipéptido de HRS de referencia, tal como se describe en la presente memoria, (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182, o cualquiera de las proteínas recogidas en las **Tablas D1-D9** o deducibles a partir de ellas) y conserva sustancialmente la actividad no canónica de ese polipéptido de referencia. Se incluyen también secuencias que difieren de las secuencias de HRS de referencia en la adición, delección o sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 o más aminoácidos pero que conservan las propiedades del polipéptido de HRS de referencia. En algunas realizaciones de la presente descripción, las adiciones o delecciones de aminoácidos tienen lugar en el extremo C y/o el extremo N del polipéptido HRS de referencia. En algunas realizaciones de la presente descripción, las adiciones de aminoácidos incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más residuos no mutados (es decir, del polipéptido de HRS de longitud completa correspondiente) que son proximales al extremo C y/o al extremo N del polipéptido de HRS de referencia.

En algunas realizaciones de la presente descripción, los polipéptidos de HRS comprenden un fragmento de polipéptido de la histidil-tRNA sintetasa de longitud completa de aproximadamente 50 a 250 aminoácidos, que

- comprende, consiste en o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de HRS expuesta en una o más de entre las SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182, o cualquiera de las proteínas recogidas en las **Tablas D1-D9** o deducibles a partir de ellas. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende, consiste en o consiste esencialmente en los residuos 1-141, 1-408, 5 1-113 ó 1-60 de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS es una variante de splicing que comprende, consiste en o consiste esencialmente en los residuos 1-60+175-509, 1-60+211-509 ó 1-60+101-509 de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos particulares de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende, consiste en o consiste esencialmente en los residuos 1-48 ó 1-506 de la SEQ ID NO: 1.
- 10 En algunas realizaciones de la presente descripción, un polipéptido de HRS de la presente descripción comprende el fragmento activo mínimo de un polipéptido de HRS de longitud completa capaz de modular una actividad antiinflamatoria *in vivo* o que tiene actividades de bloqueo de anticuerpos o linfocitos T autorreactivos. En algunos aspectos de la presente descripción, dicho fragmento activo mínimo comprende o consiste esencialmente en el dominio WHEP, (es decir, aproximadamente los aminoácidos 1-43 de la SEQ ID NO: 1). En algunos aspectos de la presente descripción, el fragmento activo mínimo comprende o consiste esencialmente en el dominio de aminoacilación, (es decir, aproximadamente los aminoácidos 54-398 de la SEQ ID NO: 1). En algunos aspectos de la presente descripción, el fragmento activo mínimo comprende o consiste esencialmente en el dominio de unión a anticodones (es decir, aproximadamente los aminoácidos 406-501 de la SEQ ID NO: 1). Se muestran otros fragmentos activos de ejemplo en la **Tabla D4** mostrada a continuación.
- 20

Tabla D4			
Fragmentos de polipéptidos de HRS de ejemplo			
Nombre	Residuo de aminoácidos Intervalo de SEQ ID NO: 1	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
HRS(1-500)	Proteína/Humana/1-500	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVF DVII RCFKRHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLR SVTSREEVDVRREDL VEEIKR	160
HRS(1-501)	Proteína/Humana/1-501	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVF DVII RCFKRHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLR SVTSREEVDVRREDL VEEIKR	161

HRS(1-502)	Proteína/Humana/1-502	MAERAALVELVVKLQGERVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSRYDLTVPFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVYIEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRT	162
HRS(1-503)	Proteína/Humana/1-503	MAERAALVELVVKLQGERVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSRYDLTVPFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVYIEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTG	163
HRS(1-504)	Proteína/Humana/1-504	MAERAALVELVVKLQGERVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSRYDLTVPFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVYIEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGO	164
HRS(1-505)	Proteína/Humana/1-505	MAERAALVELVVKLQGERVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSRYDLTVPFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVYIEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQP	165

HisRS1 ^{NS} HRS(1-506)	Proteína/Humana/1-506	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVII EAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGOPL	70
HRS(2-506)	Proteína/Humana/2-506	AERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVIIR FKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGEL LSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAMT RGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD LVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE VKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPK LSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDY YTGVII EAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMF DPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVLV ASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQ YCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLV EEIKRRTGOPL	166
HRS(1-507)	Proteína/Humana/1-507	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVII EAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGOPLC	167
HRS(1-508)	Proteína/Humana/1-508	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVII EAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGOPLCI	168

HRS(1-509)	Proteína/Humana/1-509	MAERAALVELVKLQGERVRGLKQKASAEELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESQKQFVLKTPKGTDRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPFARYLAMNKLNTNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTETQVL VASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIHGEQELKDGVIKLSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPLCIC	169
HisRS1 ^{N6} HRS(1-48)	Proteína/Humana/1-48	MAERAALVELVKLQGERVRGLKQKASAEELIEEEVAKLLK LKAQLGPD	71

En algunas realizaciones de la presente descripción, dichos fragmentos activos mínimos pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o los 29 aminoácidos de un conector flexible que conecta el dominio mínimo con una proteína heteróloga, o variante de splicing.

5

Sin desear verse limitado por ninguna teoría, la singular orientación, o conformación, del dominio WHEP en algunos polipéptidos de HRS puede contribuir a una potenciación de las actividades no canónicas y/o de bloqueo de anticuerpos observadas en estas proteínas.

- 10 Las expresiones "identidad de secuencias" o, por ejemplo, que comprende una "secuencia idéntica en el 50% a", tal como se usan en la presente memoria, se refieren a la magnitud en que las secuencias son idénticas nucleótido por nucleótido o aminoácido por aminoácido en una ventana de comparación. Así, puede calcularse un "porcentaje de identidad de secuencias" comparando dos secuencias óptimamente alineadas en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones a las que tiene lugar la base de ácidos nucleicos idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácidos idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) en las dos secuencias para producir el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana), y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencias.

20

Los términos usados para describir las relaciones de secuencias entre dos o más polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencias", "porcentaje de identidad de secuencias" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" tiene al menos 12 aunque frecuentemente 15 a 18 y a menudo al menos 25 unidades de monómeros, lo que incluye nucleótidos y residuos de aminoácidos, de longitud. Dado que dos polipéptidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, sólo una parte de la secuencia de polipéptidos completa) que es similar entre los dos polipéptidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polipéptidos, comparaciones de secuencias entre dos (o más) polipéptidos se realizan normalmente comparando secuencias de los dos polipéptidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de semejanza de secuencias. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, normalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más normalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en las que una secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinear óptimamente las dos secuencias. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de aproximadamente el 20% o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE.UU.) o por inspección y la mejor alineación (es decir, la que produce la máxima homología porcentual en la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos procedimientos seleccionados. También puede hacerse referencia a la familia BLAST de programas tal como se describe por ejemplo en Altschul y col., 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389. Puede encontrarse una exposición detallada de análisis de secuencias en la unidad 19.3 de Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, capítulo 15.

- 45 Los cálculos de semejanza de secuencias o identidad de secuencias entre secuencias (ambos términos se usan indistintamente en la presente memoria) pueden realizarse del modo siguiente. Para determinar el % de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias pueden alinearse para

finés de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o las dos de una primera y una segunda secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos para alineación óptima y pueden descartarse las secuencias no homólogas con fines de comparación). En algunas realizaciones de la presente descripción, la longitud de una secuencia de referencia alineada para fines de comparación es de al menos el 30%, preferentemente al menos el 40%, más preferentemente al menos el 50%, el 60%, y más preferentemente todavía de al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 100% de la longitud de la secuencia de referencia. A continuación se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácidos o nucleótidos que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición.

10

El % de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que debe introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias.

- 15 La comparación de secuencias y la determinación del % de identidad entre dos secuencias pueden realizarse usando un algoritmo matemático. En algunas realizaciones de la presente descripción, el % de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch, (1970, *J. Mol. Biol.* 48: 444-453) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso del hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En otra realización preferida más de la presente descripción, el % de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz a NWSgapdna.CMP y un peso del hueco de 40, 50, 60, 70 ó 80 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. Otro conjunto de parámetros de ejemplo incluye una matriz de valoración Blossum 62 con una penalización de hueco de 12, una penalización de extensión de hueco de 4 y una penalización de hueco del marco de 5. El % de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos puede determinarse también usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (1989, *Cabios*, 4: 11-17) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud del hueco de 12 y una penalización del hueco de 4.

- Las secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas descritas en la presente memoria pueden usarse como una "secuencia de búsqueda" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas y, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, y col., (1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-10). Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácidos nucleicos de la presente descripción. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas de la presente descripción. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede usarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul y col. (*Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997). Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por omisión de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

40

En algunas realizaciones de la presente descripción, las variantes de polipéptidos difieren de las secuencias de referencia de HRS correspondientes en al menos el 1% pero menos del 20%, 15%, 10% o 5% de los residuos. Si esta comparación requiere alineación, las secuencias deben alinearse para obtener una semejanza máxima. Las secuencias "en bucle" de deleciones o inserciones, o faltas de correspondencia, se consideran diferencias. Las diferencias son, de forma adecuada, diferencias o cambios en un residuo no esencial o una sustitución conservadora. En algunas realizaciones de la presente descripción, el peso molecular de una variante de polipéptido de HRS difiere de la del polipéptido de HRS de referencia en aproximadamente el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20% o más.

- 50 Se incluyen también "fragmentos" biológicamente activos de los polipéptidos de HRS de referencia, es decir, fragmentos biológicamente activos de los fragmentos de proteínas de HRS. Los fragmentos biológicamente activos representativos participan en general en una interacción, por ejemplo, una interacción intramolecular o intermolecular. Una interacción intermolecular puede ser una interacción de unión específica o una interacción enzimática. Una interacción intermolecular puede darse entre un polipéptido de HRS y una contraparte de unión celular, tal como un receptor celular u molécula hospedadora que participa en la actividad no canónica del polipéptido de HRS.

- Un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de HRS de referencia puede ser un fragmento de polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342,

343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 38, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 380, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508 o más aminoácidos contiguos o no contiguos, lo que incluye todos los números enteros (por ejemplo, 101, 102, 103) y los intervalos (por ejemplo, 50-100, 50-150, 50-200) intermedios, de las secuencias de aminoácidos expuestas en uno cualquiera de los polipéptidos de HRS de referencia descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones de la presente descripción, un fragmento biológicamente activo comprende una secuencia, dominio o motivo relacionados con una actividad no canónica. En algunas realizaciones de la presente descripción, la región en el extremo C o el extremo N de cualquier polipéptido de HRS de referencia puede estar truncada aproximadamente por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o más aminoácidos, o por aproximadamente 10-50, 20-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500 o más aminoácidos, lo que incluye todos los números enteros e intervalos intermedios (por ejemplo, 101, 102, 103, 104, 105), en la medida en que el polipéptido de HRS truncado conserve la actividad no canónica del polipéptido de referencia. En la **Tabla D5** mostrada a continuación se recogen algunos polipéptidos de HRS truncados de ejemplo.

Tabla D5		
Polipéptidos de HRS truncados de ejemplo		
Truncamientos en el extremo C		
Intervalo de HRS	Secuencia	SEQ ID NO:
1-80	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS PRQMAVREKVF DVI	74
1-79	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS PRQMAVREKVF DVI	75
1-78	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS PRQMAVREKVF D	76
1-77	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS PRQMAVREKVF	77
1-76	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS PRQMAVREKV	78
1-75	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS PRQMAVREK	79
1-74	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS PRQMAVRE	80
1-73	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS PRQMAVR	81
1-72	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS PRQMAV	82
1-71	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS PROMA	83
1-70	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS PROM	84
1-69	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS PRO	85
1-68	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS PR	86
1-67	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS P	87
1-66	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS	88
1-65	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDY	89
1-64	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRD	90
1-63	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTR	91
1-62	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKG	92
1-61	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKG	93

1-60	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLKTPK	94
1-59	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLKTP	95
1-58	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLKT	96
1-57	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLK	97
1-56	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVL	98
1-55	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFV	99
1-54	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKF	100
1-53	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOK	101
1-52	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKO	102
1-51	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESK	103
1-50	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDES	104
1-49	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDE	105
1-48	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPD	106
1-47	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGP	107
1-46	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLG	108
1-45	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQL	109
1-44	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQ	110
1-43	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKA	111
1-42	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LK	112
1-41	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK L	113
1-40	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK	114
Truncamientos en el extremo N		
2-80	AERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	115
3-80	ERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	116
4-80	RAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	117
5-80	AAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	118
6-80	AL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	119
7-80	LEELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	120
8-80	EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	121
9-80	ELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	122
10-80	LVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	123
11-80	VKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKOKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	124

12-80	KLQGERVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	125
13-80	LQGERVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	126
14-80	QGERVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	127
15-80	GERVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	128
16-80	RVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	129
17-80	VRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	130
18-80	RGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	131
19-80	GLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	132
20-80	LKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	133
21-80	KQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	134
22-80	QKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	135
23-80	QKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	136
24-80	KASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	137
25-80	ASAEIEEEVAKLLK	138
26-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI SAEIEEEVAKLLK	139
27-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI AEIEEEVAKLLK	140
28-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI ELIEEEVAKLLK	141
29-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI LIEEEVAKLLK	142
30-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI IEEEVAKLLK	143
31-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI EEEVAKLLK	144
32-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI EEVAKLLK	145
33-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI EVAKLLK	146
34-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI VAKLLK	147
35-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI AKLLK	148
36-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI KLLK	149
37-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI LLK	150
38-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI LK	151
39-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI K	152
40-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVI	153

Normalmente, el fragmento biológicamente activo tiene no menos de aproximadamente el 1%, 10%, 25% o 50% de una actividad del polipéptido de HRS de referencia biológicamente activo (es decir, actividad no canónica) del que se deriva. En los Ejemplos se describen procedimientos de ejemplo para medir dichas actividades no canónicas.

En algunas realizaciones de la presente descripción, las proteínas de HRS, variantes y fragmentos biológicamente activos de las mismas, se unen a una o más contrapartes de unión celulares con una afinidad de al menos aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 100 ó 150 nM. En algunas realizaciones de la presente descripción, la afinidad de unión de un fragmento de proteína de HRS para una contraparte de unión celular seleccionada, en particular una contraparte de unión que participa en una actividad no canónica, puede ser más fuerte que la del polipéptido de HRS de longitud completa correspondiente o una variante de polipéptido de HRS con splicing alternativa específica, en al menos aproximadamente 1,5x, 2x, 2,5x, 3x, 3,5x, 4x, 4,5x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x, 20x, 25x, 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, 200x, 300x, 400x, 500x, 600x, 700x, 800x, 900x, 1.000x o más (lo que incluye todos los números enteros intermedios).

Tal como se indica anteriormente, un polipéptido de HRS puede modificarse de diversas formas que incluyen sustituciones, deleciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los procedimientos para dichas manipulaciones son conocidos en la técnica en general. Por ejemplo, las variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido de HRS de referencia pueden prepararse mediante mutaciones en el ADN. Los procedimientos para alteraciones de mutagenia y secuencias de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985, *PNAS USA*, 82: 488-492), Kunkel y col., (1987, *Methods in Enzymol*, 154: 367-382), la patente de EE.UU. nº 4.873.192, Watson, J. D. y col., ("Molecular Biology of the Gene", 4ª edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) y las referencias citadas en las mismas. Pueden encontrarse pautas para sustituciones apropiadas de aminoácidos que no influyen en la actividad biológica de la proteína de interés en el modelo de Dayhoff y col., (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

Los polipéptidos de HRS truncados biológicamente activos y/o sus variantes pueden contener sustituciones de aminoácidos conservadoras en diversas posiciones a lo largo de su secuencia, en comparación con un residuo de aminoácidos de HRS de referencia, y dichas sustituciones adicionales pueden potenciar la actividad o estabilidad de los polipéptidos de HRS con contenido de cisteína alterado. Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es aquella en la que el residuo de aminoácidos está sustituido por un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, y en términos generales pueden subclasificarse del modo siguiente:

Ácidos: El residuo tiene una carga negativa debido a la pérdida de iones H a pH fisiológico y el residuo es atraído por la solución acuosa de manera que busca las posiciones superficiales en la conformación de un péptido en que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso a pH fisiológico. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral ácida incluyen ácido glutámico y ácido aspártico.

Básicos: El residuo tiene una carga positiva debido a la asociación con iones H a pH fisiológico o dentro de una o dos unidades de pH de los mismos (por ejemplo, histidina) y el residuo es atraído por la solución acuosa de manera que busca las posiciones superficiales en la conformación de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso a pH fisiológico. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral básica incluyen arginina, lisina e histidina.

Cargados: Los residuos están cargados a pH fisiológico y, por tanto, incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales ácida o básica (es decir, ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina e histidina).

Hidrófobos: Los residuos no están cargados a pH fisiológico y el residuo es repelido por la solución acuosa de manera que busca las posiciones interiores en la conformación de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba incluyen tirosina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina y triptófano.

Neutros/polares: Los residuos no están cargados a pH fisiológico, pero el residuo no es repelido suficientemente por las soluciones acuosas de manera que buscaría posiciones interiores en la conformación de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra/polar incluyen asparagina, glutamina, cisteína, histidina, serina y treonina.

Esta descripción caracteriza también a determinados aminoácidos como "pequeños" dado que sus cadenas laterales no son suficientemente grandes, incluso si faltan grupos polares, para conferir hidrofobia. Con la excepción de la prolina, los aminoácidos "pequeños" son aquellos que tienen cuatro carbonos o menos cuando al menos un grupo polar está en la cadena lateral y tres carbonos o menos cuando no lo está. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral pequeña incluyen glicina, serina, alanina y treonina. El aminoácido secundario de codificación genética prolina es un caso especial debido a sus efectos conocidos en la conformación secundaria de cadenas peptídicas. La estructura de prolina difiere de todos los demás aminoácidos de origen natural en que su cadena lateral está unida al

nitrógeno del grupo α -amino, así como al carbono α . En la técnica se conocen varias matrices de semejanza de aminoácidos (véase por ejemplo, matriz PAM120 y matriz PAM250 tal como se describe por ejemplo en Dayhoff y col., 1978, A model of evolutionary change in proteins). Las matrices para determinar las relaciones de distancia en M. O. Dayhoff, (ed.), Atlas of protein sequence and structure, Vol. 5, pp. 345-358, National Biomedical Research Foundation, Washington DC; y de Gonnet y col., (*Science*, 256: 14430-1445, 1992), sin embargo, incluyen la prolina en el mismo grupo que la glicina, la serina, la alanina y la treonina. Por consiguiente, para los fines de la presente descripción, la prolina se clasifica como un aminoácido "pequeño".

El grado de atracción o repulsión requerido para la clasificación como polar o polar es arbitrario y, por tanto, los aminoácidos contemplados específicamente por la presente descripción se han clasificado como uno u otro. La mayoría de los aminoácidos no designados específicamente pueden clasificarse con base en su comportamiento conocido.

Los residuos de aminoácidos pueden subclasificarse adicionalmente como cíclicos o no cíclicos, y aromáticos o no aromáticos, unas clasificaciones autoexplicativas con respecto a los grupos sustituyentes de cadena lateral de los residuos, y como pequeños o grandes. El residuo se considera pequeño si contiene uno de cuatro átomos de carbono o menos, incluido el carbono del carboxilo, siempre que esté presente un sustituyente polar adicional; tres o menos en caso contrario. Naturalmente, los residuos pequeños siempre son no aromáticos. Dependiendo de sus propiedades estructurales, los residuos de aminoácidos pueden encuadrarse en dos o más clases. Para los aminoácidos de proteínas de origen natural, se presenta en la Tabla A una subclasificación de acuerdo con este esquema.

Tabla A: Subclasificación de aminoácidos

Subclases	Aminoácidos
Ácidos	Ácido aspártico, ácido glutámico
Básicos	No cíclicos: arginina, lisina; cíclicos: histidina
Cargados	Ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina, histidina
Pequeños	Glicina, serina, alanina, treonina, prolina
Polares/neutros	Asparagina, histidina, glutamina, cisteína, serina, treonina
Polares/grandes	Asparagina, glutamina
Hidrófobos	Tirosina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano
Aromáticos	Triptófano, tirosina, fenilalanina
Residuos que influyen en la orientación de la cadena	Glicina y prolina

La sustitución de aminoácidos conservadora también incluye agrupaciones basadas en cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es el de glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es el de serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amidas es el de asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es el de fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es el de lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es el de cisteína y metionina. Por ejemplo, es razonable esperar que la sustitución de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución similar de un aminoácido por aminoácido relacionado estructuralmente no tendrá un efecto importante en las propiedades de la variante de polipéptido resultante. El hecho de que un cambio de aminoácido produzca un polipéptido de HRS truncado funcional y/o en variante puede determinarse fácilmente mediante un ensayo de su actividad no canónica, tal como se describe en la presente memoria. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla B con el epígrafe de sustituciones de ejemplo. Las sustituciones de aminoácidos que se encuadran dentro del alcance de la presente descripción, se realizan, en general, seleccionando sustituciones que no difieren significativamente en su efecto para mantener (a) la estructura de la cadena principal peptídica en la zona de la sustitución, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio objeto, (c) el volumen que ocupa la cadena lateral, o (d) la función biológica. Después de introducir las sustituciones, se analiza la actividad biológica de las variantes.

Tabla B: Sustituciones de aminoácidos de ejemplo

Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln

Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala, Leu, Val	Ser, Ala
Gln	Asn, His, Lys,	Asn
Glu	Asp, Lys	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleu	Leu
Leu	Norleu, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Ile, Phe	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleu	Leu

Alternativamente, los aminoácidos similares para realizar sustituciones conservadoras pueden agruparse en tres categorías basándose en la identidad de las cadenas laterales. El primer grupo incluye ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina, histidina, todos los cuales tienen cadenas laterales cargadas; el segundo grupo incluye glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, glutamina, asparagina; y el tercer grupo incluye leucina, isoleucina, valina, alanina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, tal como se describe en Zubay, G., *Biochemistry*, 3ª edición, Wm. C. Brown Publishers (1993).

Se ha determinado la estructura de RMN del dominio WHEP de HRS humana (véase Nameki y col., acceso 1X59_A). Además, se han determinado también las estructuras cristalinas de HRS humana de longitud completa y un mutante de delección de dominio catalítico interno de HRS (HRS Δ CD) (véase Xu y col., *Structure*. 20:1470-7, 2012; y solicitud de EE.UU. nº 61/674.639). Junto con la secuencia de aminoácidos de HRS primaria, estas descripciones físicas detalladas de la proteína proporcionan visiones precisas de los papeles que desempeñan los aminoácidos específicos dentro de la proteína. Los expertos en la materia pueden así usar esta información para identificar dominios conservados estructuralmente, regiones de unión, estructuras secundarias tales como hélices alfa, aminoácidos expuestos a disolventes o de superficie, regiones internas o no expuestas, sitios catalíticos y superficies de interacción con ligandos, entre otras características estructurales. Dichos expertos pueden usar entonces esta y otra información para diseñar fácilmente variantes de HRS que conserven o mejoren la actividad no canónica de interés, por ejemplo, conservando o modificando las características de los residuos de aminoácidos dentro de o adyacentes a estas y otras características estructurales, por ejemplo conservando o modificando la polaridad, el índice de hidropatía, la carga, el tamaño y/o la posición (es decir, interior, exterior) de la o las cadenas de aminoácidos con respecto a los residuos no mutados (véase, por ejemplo, Zaiwara y col., *Mol Biotechnol*. 51:67-102, 2012; Perona y Hadd, *Biochemistry*. 51:8705-29, 2012; Morin y col., *Trends Biotechnol*. 29:159-66, 2011; Collins y col., *Annu. Rev. Biophys.* 40:81-98, 2011; y la solicitud de EE.UU. nº 61/674.639).

Así, un residuo de aminoácidos no esencial predicho en un polipéptido de HRS truncado y/o en variante es sustituido normalmente por otro residuo de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de parte o la totalidad de una secuencia codificante de HRS, por ejemplo por mutagenia de saturación, y en los mutantes resultantes puede determinarse la actividad del polipéptido original para identificar mutantes que conservan esta actividad. Después de la mutagenia de las secuencias codificantes, el péptido codificado puede expresarse de forma recombinante y puede determinarse la actividad del péptido. Un residuo de aminoácidos "no esencial" es un residuo que puede modificarse con respecto a la secuencia de referencia de un polipéptido de la realización sin suprimir ni modificar sustancialmente una o más de sus actividades no canónicas. De forma adecuada, la alteración no suprime sustancialmente una de estas actividades, por ejemplo, la actividad es de al menos el 20%, 40%, 60%, 70% o 80% 100%, 500%, 1.000% o más de la secuencia de HRS de referencia. Un residuo de aminoácidos "esencial" es un residuo que, cuando se modifica con respecto a la secuencia de referencia de un polipéptido de HRS, produce la supresión de una actividad de la molécula original de manera que está presente menos del 20% de la actividad de referencia. Por ejemplo, dichos residuos de aminoácidos esenciales incluyen aquellos que se conservan en polipéptidos de HRS en diferentes especies, lo que incluye aquellas secuencias que se conservan en el sitio o sitios de unión activos o el o los motivos de polipéptidos de HRS de diversas fuentes.

Los ensayos para determinar la actividad antiinflamatoria, que incluye medidas rutinarias de la liberación de citocinas

de base celular *in vitro*, y los estudios con animales están bien establecidos en la técnica (véase, por ejemplo, Wittmann y col., *J Vis Exp.* (65):e4203. doi: 10.3791/4203, 2012; Feldman y col., *Mol Cell.* 47:585-95, 2012; Clutterbuck y col., *J Proteomics.* 74:704-15, 2011, Giddings y Maitra, *J Biomol Screen.* 15:1204-10, 2010; Wijnhoven y col., *Glycoconj J.* 25:177-85, 2008; y Frow y col., *Med Res Rev.* 24:276-98, 2004) y pueden usarse fácilmente para 5 perfilar y optimizar la actividad antiinflamatoria. En los Ejemplos adjuntos se describe al menos un sistema experimental *in vivo* de ejemplo.

Algunos polipéptidos de HRS pueden tener una o más sustituciones de cisteína, donde uno o más residuos de origen natural (no cisteína) están sustituidos por cisteína, por ejemplo, para modificar las características de 10 estabilidad o pK, facilitar la unión basada en tiol de las moléculas PEG, etc. En algunas realizaciones de la presente descripción, las sustituciones de cisteína están cerca del extremo N y/o el extremo C del polipéptido de HRS (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182), u otras regiones expuestas en superficie de un polipéptido de HRS. Las realizaciones particulares de la presente descripción incluyen aquellas en que uno o 15 más de los residuos en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 aminoácidos con respecto al extremo N y/o al extremo C de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182 están sustituidos por un residuo de cisteína. En algunas realizaciones de la presente descripción, los residuos de cisteína pueden añadirse al polipéptido de HRS a través de la creación de proteínas de fusión en el extremo N o C. Dichas proteínas de fusión puede ser de cualquier longitud, pero normalmente tendrán aproximadamente de 1 a 5, o aproximadamente de 5 a 10, aproximadamente de 10 a 20, o aproximadamente de 20 20 a 30 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones de la presente descripción, se prefiere la fusión en el extremo C.

En la **Tabla D6** se muestran realizaciones de ejemplo específicas de dichas proteínas modificadas con cisteína, basándose en el polipéptido de HRS HRS(1-60). Este enfoque es aplicable directamente a los polipéptidos de HRS 25 de la Tabla D5, y otros polipéptidos de HRS descritos en la presente memoria.

Tabla D6		
Nombre	Secuencias de proteínas	SEQ ID NO:
HRS(1-60)-M1MC-	MC A ERAAL E EE LVKLQGERVR GLKQ Q KASAE LIEEEVAKLL KLKAQLGPDE SKQKFVLKTP K	170
HRS(1-60)-A26C-	MAERAAL E EL VKLQGERVRG LKQ Q KCSAEL IEEEVAKLLK LKAQLGPDES KQKFVLKTPK	171
HRS(1-60)-C61	MAERAAL E EL VKLQGERVRG LKQ Q KASAEL IEEEVAKLLK LKAQLGPDES KQKFVLKTPK C	172
Secuencias de ADN		
HRS(1-60)-M1MC-	ATGTGTGCAGAAAGAGCCGCCCTGGAAGAGTTAGTTAAGTTGCAAGGTG AACGTGTCCGTGGTCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGATCGA AGAAGAGGTGGCCAAACTGCTGAAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCGGAC GAGAGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCCGAAA	173
HRS(1-60)-A26C-	ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAAACTGCAAGGTGAAC GTGTTCTGTTCTGAAGCAGCAGAAGTGCAGCGCGGAGCTGATCGAAGA AGAGGTGGCCAAACTGCTGAAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCGGACGAG AGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCCGAAA	174
HRS(1-60)-C61	ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAAACTGCAAGGTGAAC GTGTTCTGTTCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGATCGAAGA AGAGGTGGCCAAACTGCTGAAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCGGACGAG AGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCCGAAATGC	175

En algunas realizaciones de la presente descripción, la inserción o sustitución de residuo o residuos de cisteína en el polipéptido de HRS puede combinarse con la eliminación de otros residuos de cisteína expuestos en superficie. Por 30 consiguiente, en algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS puede comprender una o más sustituciones y/o deleciones en Cys83, Cys174, Cys191, Cys196, Cys224, Cys235, Cys379, Cys455, Cys507 y/o Cys509 (tal como se define en la SEQ ID NO: 1), por ejemplo, para eliminar residuos de cisteína de origen natural.

35 Las realizaciones específicas de la presente descripción incluyen una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182, o variantes de las mismas, que tienen una mutación o deleción de uno cualquiera o más de entre Cys83, Cys174, Cys191, Cys196, Cys224, Cys235, Cys379, Cys455, o la deleción de Cys507 y Cys509, por ejemplo, por la deleción de los 3 aminoácidos del extremo C (Δ507-509). Las mutaciones de ejemplo en estas posiciones incluyen por ejemplo la mutación de cisteína en serina, alanina, leucina, valina o glicina. En algunas 40 realizaciones de la presente descripción, los residuos de aminoácidos para sustituciones de cisteína específicas

pueden seleccionarse de entre sustituciones de origen natural que están presentes en ortólogos de HRS de otras especies y organismos. Las sustituciones de ejemplo de este tipo se presentan en la **Tabla D7**.

Tabla 7 Variación de secuencias de origen natural en las posiciones ocupadas por residuos de cisteína en HRS humano												
Residuo de cisteína de H. sapiens #	P. troglodyte	M. mulatta	B. aturus	M. musculus	R. norvegicus	C. gallus	X. laevis	D. rerio	D. melanogaster	C. elegans	S. cerevisiae	E. coli
83	C	C	C	C	C	C	C	C	V	T	L	V
174	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	L
191	C	C	C	C	C	C	C	C	C	V	C	A/L
196	C	C	C	C	C	Q	H	Y	S	M	V	L/A
224	C	C	C	C	C	C	C	C	C	S	A	A
235	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	S	E
379	C	C	C	C	C	C	C	V	C	C	C	A
455	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	A	A
507	C	R	C	S	S	-	-	-	-	S/Q	S/E	-
509	C	C	C	C	-	-	-	-	-	I	I/G	-

- 5 En algunas realizaciones de la presente descripción, los residuos de cisteína de origen natural seleccionados para mutagenia se identifican o se seleccionan basándose en su exposición superficial. Por consiguiente, en algunos aspectos de la presente descripción los residuos de cisteína seleccionados para sustitución se seleccionan de entre Cys224, Cys235, Cys507 y Cys509. En algunas realizaciones de la presente descripción, los últimos tres residuos (extremo C) de la SEQ ID NO: 1 están suprimidos de manera que se suprimen los residuos 507 a 509. En algunas realizaciones de la presente descripción, las cisteínas se seleccionan para mutación o delección de manera que eliminan un par de cisteínas intramoleculares, por ejemplo Cys174 y Cys191.

Los ejemplos adicionales específicos de mutaciones/sustituciones de cisteínas (indicados en negrita y subrayados) para reducir los residuos de cisteína con exposición superficial incluyen los recogidos en la **Tabla D8** mostrada a

15 continuación

Tabla D8		
Polipéptidos de HRS con sustituciones para eliminar cisteínas expuestas en superficie		
Nombre	Secuencia de proteínas	SEQ ID NO:
HRS(1-506) C174A	MAERAAL EEL VKLQGERVRLKQQKASAE LIEEE VAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIRCFKRHGA EVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELL SLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQ ADF DIAGNFDPMIPDAE CL KIMCEIL SSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGL GDLKLLFEYLT TLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEE PLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAL EEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGE QEL KDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GOPL	176
HRS(1-506) C174V	MAERAAL EEL VKLQGERVRLKQQKASAE LIEEE VAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIRCFKRHGA EVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELL SLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQ VDF DIAGNFDPMIPDAE CL KIMCEIL SSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGL GDLKLLFEYLT TLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEE PLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAL EEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGE QEL KDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GOPL	177
HRS(1-506) C191A	MAERAAL EEL VKLQGERVRLKQQKASAE LIEEE VAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIRCFKRHGA EVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELL SLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQ CD FDIAGNFDPMIPDAE AL KIMCEIL SSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGL GDLKLLFEYLT TLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEE PLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAL EEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGE QEL KDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GOPL	178
HRS(1-506) C191S	MAERAAL EEL VKLQGERVRLKQQKASAE LIEEE VAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIRCFKRHGA EVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELL SLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQ CD FDIAGNFDPMIPDAE SL KIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKN EMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLT TLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEP LGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALE EKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQ LQYCEEAGIPLVAIIGE QEL KDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTG QPL	179
HRS(1-506) C191V	MAERAAL EEL VKLQGERVRLKQQKASAE LIEEE VAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIRCFKRHGA EVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELL SLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQ CD FDIAGNFDPMIPDAE VL KIMCEIL SSLOIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGL GDLKLLFEYLT TLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEE PLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAL EEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGE QEL KDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GQPL	180
	NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGL GDLKLLFEYLT TLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEE PLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAL EEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGE QEL KDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GQPL	

HRS(1-506) C224S	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGT RDYSPRQMAVREKVF DVIIRCFKRHGA EVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDP MIPDAECLKIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAISGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKN EMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGV IYEAVLLQTPAQAGEEP LGVGSAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEALE EKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNP KLLNQ LQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLR SVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTG OPL	181
HRS(1-506) C235S	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGT RDYSPRQMAVREKVF DVIIRCFKRHGA EVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDP MIPDAECLKIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTISSVDKLDKVSWE EVKN EMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGV IYEAVLLQTPAQAGEEP LGVGSAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEALE EKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNP KLLNQ LQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLR SVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTG OPL	182
Nombre	Secuencias de ADN	SEQ ID NO: 183
HRS(1-506) C174A	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTCTGTGAAAAAGTGTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAAGTCTGAGCCTGCG CTACGACTTAAGTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGGCTGATTTTGA TATTGCCGGAAATTTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTGTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCGGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGT TTTCTGATTCCAAATTCGTAACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGAAGTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGCGGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGTTGTCGTTATGATGGTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAaCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAAGTCTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAGATGGCGTGATTAAGTCTGCGTTACAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	

HRS(1-506) C174V	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCCGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAAGTGTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAAGTATATCGCCCGGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGGTTGATTTTGA TATTGCCGGAATTTGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCGTAACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGAAGTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAAACCCAGCCAGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGTTGGTTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCTTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAaACCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAAGTCTGTATATAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	184
HRS(1-506) C191A	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCCGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAAGTGTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAAGTATATCGCCCGGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAATTTGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGGCTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCGTAACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGAAGTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAAACCCAGCCAGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGTTGGTTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCTTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAaACCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAAGTCTGTATATAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	185
	CATCAAGGCCGAAGTCTGTATATAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	

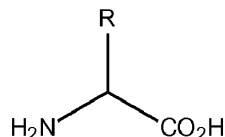
HRS(1-506) C191S	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAAGTGTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAATTTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGAGTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCGTAACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGAAGTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAaACCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAAGCTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAGATGGCGTGATTAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	186
HRS(1-506) C191V	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAAGTGTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAATTTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGGTTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCGTAACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGAAGTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC	187
	GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAaACCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAAGCTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAGATGGCGTGATTAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	

HRS(1-506) C224S	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAAGTGTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAATTTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTGTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTCCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCGGTACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGAAGTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAaAcCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCGTGAAGTCTGATCAGAAGCTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	188
HRS(1-506) C235S	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAAGTGTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAATTTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTGTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCGGTACAATCTCCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGAAGTGTGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAaAcCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCGTGAAGTCTGATCAGAAGCTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	189
	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAAGTGTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAATTTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTGTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCGGTACAATCTCCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGAAGTGTGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAaAcCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCGTGAAGTCTGATCAGAAGCTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	

En algunas realizaciones de la presente descripción, dichos mutantes sustituidos por cisteína se modifican para diseñar, insertar o introducir por otros medios un residuo de cisteína con exposición superficial en una superficie definida, donde el residuo introducido no interfiere sustancialmente con la actividad no canónica del polipéptido de HRS. Los ejemplos específicos incluyen por ejemplo la inserción (o reinserción) de residuos de cisteína adicionales en el extremo N o C de cualquiera de los polipéptidos de HRS de cisteína reducidos descritos anteriormente. En algunas realizaciones de la presente descripción, la inserción de dichas cisteínas de exposición superficial en el extremo N o C implica la reinserción del último 1, los últimos 2 o los últimos 3 aminoácidos en el extremo C de origen natural de la HRS humana de longitud completa en una variante de cisteína reducida de un polipéptido de HRS por ejemplo, la reinserción de parte o la totalidad de la secuencia CIC (Cys Ile Cys). Los mutantes de cisteína reducidos de ejemplo incluyen por ejemplo cualquier combinación de mutaciones (o la delección de) en los residuos Cys174, Cys191, Cys224 y Cys235, y/o la delección o sustitución de Cys507 y Cys509 (basándose en la numeración de HRS humana de longitud completa (SEQ ID NO: 1) en cualquiera de los polipéptidos de HRS de la SEQ ID NO: 1-106, 131-133, 137-143, 178, 180, 182, 184 ó 186-195 o cualquiera de los polipéptidos de HRS recogidos en las **Tablas D1-D9** o deducibles a partir de ellos.

En varias realizaciones de la presente descripción, la presente descripción contempla modificaciones en cualquier posición de aminoácido en un polipéptido de HRS en virtud de la sustitución de un aminoácido de origen natural que comprende opcionalmente un grupo funcional. Los aminoácidos no naturales pueden insertarse o sustituirse, por ejemplo, en uno o más de residuos de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 aminoácidos con respecto al extremo N y/o el extremo C de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182 (o cualquiera de los polipéptidos de HRS recogidos en las **Tablas D1-D9** o deducibles a partir de ellos); en el extremo N y/o el extremo C de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182 (o cualquiera de los polipéptidos de HRS recogidos en las **Tablas D1-D9** o deducibles a partir de ellos); o un residuo de aminoácidos de superficie accesible para el disolvente tal como se describe en la presente memoria.

En realizaciones particulares de la presente descripción, los aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, cualquier aminoácido, aminoácido modificado o análogo de aminoácido diferente a la selenocisteína y los siguientes veinte alfa-aminoácidos codificados genéticamente: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina. La estructura genérica de un alfa-aminoácido se ilustra mediante la fórmula siguiente:



Un aminoácido no natural es normalmente cualquier estructura que tiene la fórmula anterior donde el grupo R es cualquier sustituyente distinto al usado en los veinte aminoácidos naturales. Consúltense, por ejemplo, textos de bioquímica tales como Biochemistry de L. Stryer, 3ª ed. 1988, Freeman and Company, Nueva York, sobre estructuras de los veinte aminoácidos naturales. Debe observarse que los aminoácidos no naturales descritos en la presente memoria pueden ser compuestos de origen natural distintos a los veinte alfa-aminoácidos anteriores. Dado que los aminoácidos no naturales descritos en la presente memoria difieren normalmente de los aminoácidos naturales sólo en la cadena lateral, los aminoácidos no naturales forman enlaces de amida con otros aminoácidos, por ejemplo, naturales o no naturales, del mismo modo en que se forman en proteínas de origen natural. Sin embargo, los aminoácidos no naturales tienen grupos de cadena lateral que los distinguen de los aminoácidos naturales. Por ejemplo, R en la fórmula anterior comprende opcionalmente un grupo alquil-, aril-, haluro de arilo, haluro de vinilo, haluro de alquilo, acetilo, cetona, aziridina, nitrilo, nitro, haluro, acil-, ceto-, azido-, hidroxil-, hidracina, ciano-, halo-, hidracida, alqueno, alquino, éter, tioéter, epóxido, sulfona, ácido borónico, éster boronato, borano, ácido fenilborónico, tiol, seleno-, sulfonil-, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico-, piridilo, naftilo, benzofenona, un anillo restringido tal como un ciclooctino, tioéter, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina, amino, ácido carboxílico, ácido alfa-ceto carboxílico, ácidos alfa o beta insaturados y amidas, glioxilamida u organosilano, o similares o cualquier combinación de los mismos.

Los ejemplos específicos de aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a, p-acetil-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, una L-3-(2-naftil)alanina, una 3-metil-fenilalanina, una O-4-alil-L-tirosina, una 4-propil-L-tirosina, una tri-O-acetil-GlcNAc-β-serina, β-O-GlcNAc-L-serina, una tri-O-acetil-GalNAc-α-treonina, una α-GalNAc-L-treonina, una L-Dopa, una fenilalanina fluorada, una isopropil-L-fenilalanina, una p-azido-L-fenilalanina, una p-acil-L-fenilalanina, una

p-benzoil-L-fenilalanina, una L-fosfoserina, una fosfonoserina, una fosfonotirosina, una p-yodo-fenilalanina, una p-bromofenilalanina, una p-amino-L-fenilalanina, una isopropil-L-fenilalanina, las enumeradas más adelante, o en otras partes de la presente memoria, y similares.

5 Por consiguiente, es posible seleccionar un aminoácido de origen natural que comprende un grupo funcional que forma un enlace covalente con cualquier grupo funcional preferido de fracción heteróloga, por ejemplo, una fracción PEG. Los aminoácidos no naturales, una vez seleccionados, pueden ser adquiridos de vendedores o sintetizarse por medios químicos. Puede incorporarse cualquier número de aminoácidos no naturales en la molécula diana y puede variar de acuerdo con el número de polímeros solubles en agua deseados, por ejemplo, fracciones de PEG, a las
10 que deben unirse. Las fracciones pueden unirse a todos o sólo algunos de los aminoácidos no naturales. Además, pueden incorporarse los mismos aminoácidos no naturales o diferentes en un polipéptido de HRS, dependiendo del resultado que se desee. En algunas realizaciones de la presente descripción, se incorporan aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos no naturales en un polipéptido de HRS, parte o la totalidad de los cuales pueden conjugarse en una fracción heteróloga que comprende un grupo funcional deseado.

15 Algunas realizaciones de la presente descripción contemplan también el uso de polipéptidos de HRS modificados, que incluyen modificaciones que mejoran las características deseadas de un polipéptido de HRS, tal como se describe en la presente memoria. Las modificaciones de polipéptidos de HRS de la presente descripción incluyen derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones de
20 cadena lateral, modificaciones de cadena principal y modificaciones en el extremo N y C que incluyen acetilación, hidroxilación, metilación, amidación y la unión de fracciones de proteínas de fusión, hidratos de carbono o lípidos, cofactores, la sustitución de aminoácidos D y similares. Las modificaciones de ejemplo incluyen también PEGilación de un polipéptido de HRS (véase, por ejemplo, Veronese y Harris, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 453-456, 2002; y Pasut y col., *Expert Opinion. Ther. Patents* 14(6) 859-894 2004). En algunas realizaciones de la presente
25 descripción, dichos polipéptidos de HRS PEGilados comprenden una mutación para añadir o eliminar una cisteína endógena, al objeto de facilitar el acoplamiento selectivo por medio de una cisteína exógena o endógena u otro residuo.

PEG es un polímero bien conocido que tiene las propiedades de solubilidad en agua y en muchos disolventes
30 orgánicos, ausencia de toxicidad y ausencia de inmunogenicidad. Además es transparente, incoloro, inodoro y químicamente estable. Por estos y otros motivos, PEG se ha seleccionado como el polímero preferido para la fijación, pero se ha empleado exclusivamente con fines de ilustración y no de limitación. Pueden obtenerse productos similares con otros polímeros solubles en agua, que incluyen sin limitación; polialcohol vinílico, otros poli(óxidos de alqueno) tales como poli(propilenglicol) y similares, poli(polioloxietilados) tales como poli(glicerol
35 oxietilado) y similares, carboximetilcelulosa, dextrano, polialcohol vinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3- dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, anhídrido etilénico/maleico, y poliaminoácidos. Un experto en la materia sabrá seleccionar el polímero deseado basándose en la dosificación deseada, el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis y otras consideraciones.

40 En particular se dispone de una amplia variedad de derivados de PEG adecuados para su uso en la preparación de conjugados PEG. Por ejemplo, los reactivos PEG de NOF Corp. Comercializados con la marca SUNBRIGHT® Series proporcionan numerosos derivados de PEG, que incluyen metoxipolietilenglicoles y derivados de PEG activados tales como metoxi-PEG aminas, maleimidas, ésteres de N-hidroxisuccinimida y ácidos carboxílicos, para su acoplamiento mediante diversos al extremo N, el extremo C o cualquier aminoácido interno del polipéptido AARS.
45 La tecnología de PEGilación avanzada de Nektar Therapeutics ofrece también diversas tecnologías de acoplamiento a PEG para mejorar potencialmente la seguridad y la eficacia de una terapéutica basada en polipéptidos de HRS.

Las patentes, las solicitudes de patente publicadas y las publicaciones relacionadas proporcionarán también a los expertos en la materia que leen la presente descripción tecnologías de acoplamiento PEG posibles de interés y
50 derivados PEG. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 6.436.386; 5.932.462; 5.900.461; 5.824.784; y 4.904.584 que describen dichas tecnologías y derivados, así como procedimientos para su fabricación.

En algunos aspectos de la presente descripción, puede usarse la tecnología de unión quimioselectiva para modificar los polipéptidos de HRS descritos en la presente memoria, tal como la unión de polímeros de una forma controlada y
55 específica del sitio. Dicha tecnología depende normalmente de la incorporación de anclajes quimioselectivos en la estructura principal de la proteína por medios químicos, o recombinantes, y la posterior modificación con un polímero que lleva un conector complementario. Como consecuencia, el proceso de ensamblaje y la estructura covalente del conjugado proteína-polímero resultante pueden ser controlados, lo que permite la optimización racional de las propiedades farmacológicas, tales como la eficacia y las propiedades farmacocinéticas (véase, por ejemplo,
60 Kochendoerfer, *Current Opinion in Chemical Biology* 9:555-560, 2005).

En otras realizaciones de la presente descripción, se incluyen también las proteínas de fusión de polipéptido de HRS con otras proteínas, y estas proteínas de fusión pueden modular la actividad biológica del polipéptido de HRS, la secreción, la antigenicidad, el direccionamiento, la vida biológica, la capacidad de penetrar a través de las membranas celulares o la barrera hematoencefálica, o las propiedades farmacocinéticas. Los ejemplos de proteínas de fusión que mejoran las propiedades farmacocinéticas ("modificadores PK") incluyen sin limitación, fusiones con albúmina humana (Osborn y col. *Eur. J. Pharmacol.* 456(1-3): 149-158, (2002)), dominios de anticuerpos Fc, secuencias poli Glu o poli Asp y transferrina. Además, la fusión con secuencias de polipéptidos modificadas conformacionalmente compuestas por los aminoácidos Pro, Ala, y Ser (PASilación') o hidroxietilalmidón (comercializado con la marca HESYLATION®) proporciona una forma sencilla de incrementar el volumen hidrodinámico del polipéptido de HRS. Esta extensión adicional adopta una estructura aleatoria voluminosa, que aumenta significativamente el tamaño de la proteína de fusión resultante. Por este medio, el aclaramiento normalmente rápido de los polipéptidos de HRS de menor tamaño por medio de filtrado renal se retrasa en varios órdenes de magnitud. Además, se ha demostrado también que el uso de proteínas de fusión IgG facilita la penetración por algunas proteínas de fusión de la barrera hematoencefálica (Fu y col., (2010) *Brain Res.* 1352:208-13).

Los ejemplos de proteínas de fusión que modulan la antigenicidad o las propiedades inmunomoduladoras del polipéptido de HRS incluyen fusiones con ligandos de unión a linfocitos T, que incluyen por ejemplo, proteínas MHC de clase I y II, microglobulina b-2, partes de LFA-3, partes de la región Fc de la cadena pesada y conjugados y derivados de las mismas; se describen ejemplos de dichas proteínas de fusión por ejemplo en el documento EP-1.964.854, las patentes de EE.UU. nº 5.468.481; 5.130.297; 5.635.363; 6.451.314 y el documento US-2009/0.280.135.

Además en algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS puede incluir secuencias de señales de secreción sintéticas o de origen natural, derivadas de otras proteínas secretadas bien caracterizadas. En algunas realizaciones de la presente descripción dichas proteínas pueden procesarse mediante escisión proteolítica para formar el polipéptido de HRS *in situ*. En algunas realizaciones de la presente descripción el polipéptido de HRS puede comprender sitios de escisión proteolítica heteróloga, para facilitar la expresión *in situ* y la producción del polipéptido de HRS en una posición intracelular o extracelular. Otras proteínas de fusión pueden incluir también por ejemplo fusiones de polipéptido de HRS con ubiquitina para proporcionar un nuevo aminoácido en el extremo N, o el uso de una señal de secreción para mediar en la secreción a alto nivel del polipéptido de HRS en el medio extracelular, o marcas de epítomos en el extremo N o C para mejorar la purificación o detección.

En algunos aspectos de la presente descripción, el uso de aminoácidos no naturales puede usarse para modificar (por ejemplo, aumentar) una actividad no canónica seleccionada de un polipéptido de HRS, o para alterar la vida media *in vivo* o *in vitro* de la proteína. Los aminoácidos no naturales también pueden usarse para facilitar modificaciones químicas (selectivas) (por ejemplo, pegilación) de una proteína de HRS, tal como se describe en otro lugar en la presente memoria. Por ejemplo, algunos aminoácidos no naturales permiten una fijación selectiva de polímeros tales como PEG a una proteína dada, y mejoran de este modo sus propiedades farmacocinéticas.

Pueden encontrarse ejemplos específicos de análogos y miméticos de aminoácidos descritos, por ejemplo, en Roberts y Vellaccio, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, ed. Gross y Meinhofer, Vol. 5, p. 341, Academic Press, Inc., Nueva York, N.Y. (1983). Otros ejemplos incluyen aminoácidos perialquilados, en particular aminoácidos permetilados. Véase, por ejemplo, *Combinatorial Chemistry*, ed. Wilson y Czarnik, Ch. 11, p. 235, John Wiley & Sons Inc., Nueva York, N.Y. (1997). Otros ejemplos más incluyen aminoácidos cuya parte de amida (y, por tanto, la estructura principal de amida del péptido resultante) ha sido sustituida, por ejemplo, por un anillo de azúcar, esteroide, benzodiazepina o ciclo de carbono. Véase, por ejemplo, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, ed. Manfred E. Wolff, Cap. 15, págs. 619-620, John Wiley & Sons Inc., Nueva York, N.Y. (1995). Los procedimientos para sintetizar péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos y proteínas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.420.109; M. Bodanzsky, *Principles of Peptide Synthesis* (1ª ed. y 2ª ed. rev.), Springer-Verlag, Nueva York, N.Y. (1984 & 1993), véase capítulo 7; Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, (2ª ed.), Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984)). Por consiguiente, los polipéptidos de HRS de la presente descripción pueden estar compuestos por aminoácidos de origen natural y de origen no natural así como análogos y miméticos de aminoácidos.

En algunas realizaciones de la presente descripción, los polipéptidos de HRS modificados o variantes descritos en la presente memoria, por ejemplo, polipéptidos de HRS con contenido reducido de cisteína, presentan propiedades bioquímicas, físicas y/o farmacocinéticas alteradas (por ejemplo, mejoradas, aumentadas, disminuidas, reducidas) con respecto a polipéptidos de HRS no modificados o no variantes (por ejemplo, HRS humana de tipo no mutado de longitud completa (SEQ ID NO: 1); un fragmento o secuencia de HRS correspondiente con residuos de cisteína de tipo no mutado) en condiciones idénticas o por lo demás comparables. En algunas realizaciones de la presente

- descripción, el polipéptido de HRS modificado variante que tienen propiedades bioquímicas, físicas y/o farmacocinéticas alteradas tiene una mutación (por ejemplo, delección, sustitución) de uno cualquiera o más de entre Cys174, Cys191, Cys224, Cys235, Cys455, Cys507 y Cys509, tal como se describe en la presente memoria. En realizaciones específicas de la presente descripción, el polipéptido de HRS modificado o variante tiene una mutación de Cys507 y Cys509, por ejemplo, una delección de los residuos 507-509 (Δ 507-509). Algunos polipéptidos de HRS modificados o variantes comprenden los residuos 1-506 ó 2-506 de la SEQ ID NO: 1 (o una variante de los mismos) pero carecen de los residuos 507-509 de la SEQ ID NO: 1 (también referidos como HRS(1-506), HRS(2-506)) y opcionalmente tienen propiedades bioquímicas, físicas y/o farmacocinéticas mejoradas con respecto a HRS humana de longitud completa (SEQ ID NO: 1).
- Los ejemplos de propiedades bioquímicas, físicas y farmacocinéticas incluyen, sin limitación, actividad biológica absoluta (por ejemplo, actividad no canónica), estabilidad (por ejemplo, vida media, cinética o estabilidad térmica, estabilidad funcional, susceptibilidad a oxidación), claridad (por ejemplo, turbiedad, opalescencia) en solución, formación de agregados en solución, homogeneidad o monodispersión en solución (por ejemplo, proporción alterada de formas monomérica/dimérica o monomérica/oligomérica, niveles alterados de formación de enlaces de disulfuro entre cadenas), inmunogenicidad, reactividad cruzada, unión no específica, expresión mejorada en bacterias tales como *E. coli*, (por ejemplo contaminación reducida de endotoxinas, homogeneidad mejorada, homogeneidad de carga mejorada), mejora en el rendimiento de proteínas solubles, reducción de la unión a endotoxinas, grado de degradación en solución, biodisponibilidad (la fracción de un fármaco que se absorbe), distribución de tejidos, volumen de distribución (volumen aparente en que un fármaco se distribuye inmediatamente después de haber sido inyectado por vía intravenosa y equilibrado entre el plasma y los tejidos circundantes), concentración (concentración inicial o de estado estacionario de fármaco en plasma), constante de velocidad de eliminación (velocidad a la que se eliminan los fármacos del organismo), velocidad de eliminación (velocidad de infusión necesaria para equilibrar la eliminación), área bajo la curva (AUC; integral de la curva de concentración-tiempo, después de una sola dosis o en estado estacionario), aclaramiento (volumen de plasma aclarado del fármaco por unidad de tiempo), $C_{\max}$ (concentración máxima en plasma de un fármaco después de administración oral), $t_{\max}$ (tiempo hasta alcanzar $C_{\max}$), $C_{\min}$ (concentración mínima que un fármaco alcanza antes de administrar la dosis siguiente) y fluctuación (fluctuación pico-valle en un intervalo de dosificación en estado estacionario).
- En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS modificado o variante tiene un perfil AUC farmacocinético en plasma o suero de al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces mayor o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% mayor que un polipéptido de HRS no modificado o no variante correspondiente tras la administración a un mamífero.
- En algunos aspectos de la presente descripción, estas propiedades mejoradas se consiguen sin alterar significativamente la estructura secundaria y/o reducir la actividad biológica no canónica del polipéptido de HRS variante o modificado. De hecho, algunos polipéptidos de HRS variantes o modificados presentan una mayor actividad biológica no canónica. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente descripción, un polipéptido de HRS modificado o variante tiene una actividad biológica mayor (por ejemplo, absoluta) con respecto a un polipéptido de HRS no modificado o no variante en condiciones comparables. Las actividades de ejemplo incluyen cualquiera de las actividades no canónicas descritas en la presente memoria, tales como actividades antiinflamatorias y la capacidad de unirse a anticuerpos anti-Jo-1 u otros agentes de unión celular. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS modificado o variante tiene una actividad al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces mayor o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% mayor que un polipéptido de HRS no modificado o no variante en condiciones idénticas o por lo demás comparables.
- En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS modificado o variante tiene una CI_{50} menor (es decir, mayor afinidad de unión) para la unión a un anticuerpo Jo-1 en comparación con la proteína no modificada de longitud completa (SEQ ID NO: 1) en un ensayo ELISA. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS modificado o variante tiene una CI_{50} en un ensayo ELISA competitivo de Jo-1 que es al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% menor que un polipéptido de HRS no modificado o no variante en condiciones idénticas o por lo demás comparables. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS modificado o variante tiene una CI_{50} en un ensayo ELISA competitivo de Jo-1 que es inferior a aproximadamente 0,2 nM, inferior a aproximadamente 0,18 nM, inferior a aproximadamente 0,16 nM o inferior o igual a aproximadamente 0,15 nM.
- En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS modificado o variante tiene mayor "estabilidad" (por ejemplo, medida según la vida media, la velocidad de degradación de proteínas) que es al menos

aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces mayor o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% mayor que un polipéptido de HRS no modificado o no variante en condiciones idénticas o por lo demás comparables. En realizaciones particulares de la presente descripción, un

5 polipéptido de HRS modificado o variante tiene una vida media dentro de un conjunto dado de condiciones (por ejemplo, temperatura, pH) de al menos aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas,

10 aproximadamente 96 horas, aproximadamente 120 horas, aproximadamente 144 horas, aproximadamente 168 horas, aproximadamente 192 horas, aproximadamente 216 horas o más, aproximadamente 240 horas o más, o cualquier intervalo intermedio de vida media.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la "estabilidad" de un polipéptido de HRS incluye su

15 "estabilidad funcional", o la velocidad a la que al menos una actividad biológica se reduce en un conjunto dado de condiciones con el tiempo. Las actividades biológicas de ejemplo incluyen una cualquiera o más de entre las actividades no canónicas descritas en la presente memoria, y la retención de al menos un epítipo que experimenta una reacción cruzada específicamente con un autoanticuerpo o linfocito T autorreactivo de una enfermedad asociada con autoanticuerpos a la HRS humana. En algunas realizaciones de la presente descripción, la actividad biológica de

20 un polipéptido de HRS modificado o variante se reduce en una velocidad que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces más lenta o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% más lenta que un polipéptido de HRS no modificado o no variante en condiciones idénticas o por lo demás comparables.

25 En algunas realizaciones de la presente descripción, la "estabilidad" de un polipéptido de HRS incluye su "estabilidad cinética" o "estabilidad térmica", que incluye su velocidad de desplegado en un conjunto dado de condiciones con el tiempo. Una proteína que es cinéticamente estable se desplegará más lentamente que una proteína cinéticamente inestable. En una proteína cinéticamente estable, se necesita una barrera de energía libre

30 alta para el desplegado y los factores que influyen en la estabilidad son las energías libres relativas del estado plegado (G_f) y de transición (G_{ts}) para la primera etapa comprometida en la vía de desplegado. Una proteína puede desnaturalizarse irreversiblemente si la proteína desplegada experimenta rápidamente algún cambio permanente tal como agregación o degradación proteolítica. En realizaciones particulares de la presente descripción, un polipéptido de HRS modificado o variante se despliega a una velocidad que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

35 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces más lenta o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% más lenta que un polipéptido de HRS no modificado o no variante en condiciones idénticas o por lo demás comparables. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS modificado o variante tiene una temperatura de fusión (T_f) que es al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,

40 80%, 90%, 100% mayor que la temperatura de fusión de un polipéptido de HRS no modificado o no variante en condiciones idénticas o por lo demás comparables. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS modificado o variante tiene una temperatura de fusión (T_f) que es al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34,

35 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50°C superior que un polipéptido de HRS no modificado o no variante en condiciones idénticas o por lo demás comparables. La temperatura de fusión puede medirse, por ejemplo, por fluorimetría de barrido diferencial (DSF).

En algunas realizaciones de la presente descripción, un polipéptido de HRS modificado o variante tiene homogeneidad o monodispersión mejorada o aumentada (por ejemplo, proporción de monómeros/oligómeros,

50 proporción de dímeros/oligómeros, proporción de monómeros/dímeros, proporción de dímeros/monómeros, proporción de formación de enlaces de disulfuro entre cadenas en condiciones reducidas, distribución de pesos moleculares aparentes, lo que incluye una reducción de los picos de peso molecular alto o bajo peso molecular detectados por análisis de SDS-PAGE o HPLC) en solución con respecto a un polipéptido de HRS no modificado o no variante. En algunas realizaciones de la presente descripción, la homogeneidad o monodispersión de un

55 polipéptido de HRS modificado o variante está aumentada en al menos aproximadamente al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% con respecto a un polipéptido de HRS no modificado o no variante en condiciones idénticas o por lo demás comparables. En realizaciones específicas de la presente descripción, el polipéptido de HRS que tiene una delección

60 ($\Delta 507-509$) o sustitución de los residuos de cisteína en el extremo C Cys507 y Cys509 tiene una homogeneidad (por ejemplo, proporción de monómeros/oligómeros) en solución mayor que un polipéptido de HRS correspondiente que

tiene uno o los dos de entre Cys507/Cys509 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1). Sin desear verse limitado por ninguna teoría, la HRS humana de longitud completa se oligomeriza por medio de los residuos de cisteína en el extremo C Cys507/Cys509, y la sustitución o delección de uno o los dos de estos residuos de cisteína puede aumentar la homogeneidad del polipéptido de HRS en solución (por ejemplo, tampón fisiológico, composición farmacéutica/terapéutica, líquido biológico tal como sangre o plasma). En realizaciones específicas de la presente descripción, el polipéptido de HRS variante es HRS(1-506) (SEQ ID NO: 70) o HRS(2-506). El aumento de homogeneidad de monómeros en solución puede conducir también, por ejemplo, a un aumento de la actividad biológica, la estabilidad y otras propiedades descritas en la presente memoria.

- 10 En algunas realizaciones de la presente descripción, un polipéptido de HRS modificado o variante tiene turbiedad reducida (por ejemplo, grado de formación de partículas o fibras) en solución con respecto a un polipéptido de HRS no modificado o no variante. En algunas realizaciones de la presente descripción, la turbiedad de un polipéptido de HRS modificado o variante se reduce en aproximadamente o al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces, o
- 15 aproximadamente o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% con respecto a un polipéptido de HRS no modificado o no variante en condiciones idénticas o por lo demás comparables. La turbiedad puede medirse, por ejemplo, por absorbancia a A340.

- En algunas realizaciones de la presente descripción, un polipéptido de HRS modificado o variante tiene opalescencia en solución reducida con respecto a un polipéptido de HRS no modificado o no variante. En algunas realizaciones de la presente descripción, la opalescencia de un polipéptido de HRS modificado o variante se reduce en al menos aproximadamente al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% con respecto a un polipéptido de HRS no modificado o no variante en
- 20 condiciones idénticas o por lo demás comparables. La opalescencia puede medirse, por ejemplo, por absorbancia a A580.

- En algunas realizaciones de la presente descripción, un polipéptido de HRS modificado o variante tiene agregados reducidos (por ejemplo, agregados de peso molecular alto, agregados de bajo peso molecular) en solución con respecto a un polipéptido de HRS no modificado o no variante. En algunas realizaciones de la presente descripción, la formación de agregados de un polipéptido de HRS modificado o variante se reduce en aproximadamente o al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces, o aproximadamente o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% con respecto a un polipéptido de HRS no
- 30 modificado o no variante en condiciones idénticas o por lo demás comparables. La agregación puede medirse, por ejemplo, por HPLC de reducción de tamaño o análisis de SDS-PAGE. Los niveles de agregación superiores también pueden monitorizarse mediante medidas de la turbiedad, tal como se describe en la presente memoria.

- En algunas realizaciones de la presente descripción, un polipéptido de HRS modificado o variante tiene un mejor rendimiento en *E. coli* que un polipéptido de HRS no modificado o no variante. En algunas realizaciones de la presente descripción, el rendimiento mejora en al menos aproximadamente 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces, o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% con respecto a un polipéptido de HRS no modificado o no variante producido en condiciones idénticas o por lo demás comparables.

- 45 En algunas realizaciones de la presente descripción, un polipéptido de HRS modificado o variante tiene una mayor pureza y/o un contenido de endotoxinas reducido después de la expresión y purificación a partir de *E. coli* con respecto a un polipéptido de HRS no modificado o no variante. En algunas realizaciones de la presente descripción, el nivel de endotoxinas se reduce en al menos aproximadamente 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces, o al menos
- 50 aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% con respecto a un polipéptido de HRS no modificado o no variante producido en condiciones idénticas o por lo demás comparables.

- En algunas realizaciones de la presente descripción, un polipéptido de HRS modificado o variante tiene una fragmentación en solución reducida con respecto a un polipéptido de HRS no modificado o no variante. En algunas realizaciones de la presente descripción, el grado de fragmentación de un polipéptido de HRS modificado o variante se reduce en al menos aproximadamente al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% con respecto a un polipéptido de HRS no
- 60 modificado o no variante en condiciones idénticas o por lo demás comparables. La fragmentación puede medirse, por ejemplo, por análisis de SDS-PAGE y HPLC de reducción de tamaño.

Las condiciones de ejemplo para medir cualquiera de las propiedades bioquímicas, físicas y/o farmacocinéticas descritas en la presente memoria incluyen "condiciones fisiológicas", tales como un intervalo de temperatura de ~20-40°C, una presión atmosférica de ~1 y un pH de ~6-8. Los ejemplos generales de condiciones incluyen, sin limitación, condiciones *in vivo* tras la administración a un mamífero, *in vitro* o condiciones de solución en un fluido biológico (por ejemplo, sangre, suero, cultivo de tejido), e *in vitro* o condiciones de solución en un tampón fisiológico o una composición farmacéutica/terapéutica. Las composiciones farmacéuticas/terapéuticas de ejemplo se describen en otro lugar en la presente memoria. En algunas realizaciones de la presente descripción, las condiciones incluyen una temperatura de aproximadamente -80, -60, -40, -20, -10, -5, -4, -3, -20, -2, -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 ó 100°C, que incluye todos los números enteros e intervalos intermedios. En algunas realizaciones de la presente descripción, las condiciones incluyen un pH de aproximadamente 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 ó 8,0, que incluye todos los números enteros e intervalos intermedios.

Las propiedades farmacocinéticas, bioquímicas y/o físicas descritas en la presente memoria pueden medirse en cualquier condición dada o en condiciones cambiantes (por ejemplo, aumento de la temperatura) durante aproximadamente 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 horas, o aproximadamente 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 días, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ó 24 semanas, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 meses o aproximadamente. En algunas realizaciones de la presente descripción, las propiedades farmacocinéticas, bioquímicas y/o físicas se miden después de la congelación/descongelación de una composición al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces.

25 **Polinucleótidos de HRS**

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a polinucleótidos que codifican un polipéptido de HRS, que incluye truncamientos y/o variantes de los mismos, así como a composiciones que comprenden dichos polinucleótidos. Entre otros usos, estas realizaciones de la presente descripción pueden usarse para producir de forma recombinante un polipéptido de HRS deseado o una variante del mismo, o para expresar el polipéptido de HRS en una célula o sujeto seleccionados. Las secuencias de nucleótidos de origen natural representativas que codifican los polipéptidos de HRS naturales incluyen por ejemplo GeneBank nº de acceso AK000498.1 y U18937.1.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "ADN" y "polinucleótido" y "ácido nucleico" se refieren a una molécula de ADN que ha sido aislada libre de ADN genómico total de una especie en particular. Por tanto, un segmento de ADN que codifica un polipéptido se refiere a un segmento de ADN que contiene una o más secuencias codificantes aunque está aislado sustancialmente, o libre y purificado, del ADN genómico total de la especie de la que se obtiene el segmento de ADN. En los términos "segmento de ADN" y "polinucleótido" se incluyen segmentos de ADN y fragmentos menores de dichos segmentos, y también vectores recombinantes, lo que incluye, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagémidos, fagos, virus y similares.

Como entenderán los expertos en la materia, las secuencias de polinucleótidos de la presente descripción pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extragenómicas y codificadas por plásmidos y segmentos génicos diseñados más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, péptidos y similares. Dichos segmentos pueden ser aislados naturalmente, o modificados mediante síntesis por la mano del hombre.

Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o de ARN. En un polinucleótido de la presente invención pueden estar presentes, aunque no es necesario secuencias codificantes o no codificantes adicionales, y un polinucleótido puede estar ligado, pero no necesariamente, a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia natural (es decir, una secuencia endógena que codifica un polipéptido de HRS o una parte del mismo) o pueden comprender una variante, o un equivalente funcional biológico de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótidos pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, como se describe en detalle más adelante, preferentemente de manera que la actividad moduladora de la respuesta inflamatoria del polipéptido codificado no disminuye sustancialmente con respecto al polipéptido no modificado. El efecto en la actividad moduladora de la respuesta inflamatoria del polipéptido codificado puede valorarse en general tal como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la presente descripción proporciona polinucleótidos aislados

que comprenden diversas longitudes de tramos contiguos de secuencia idénticos o complementarios al polipéptido de HRS, donde los polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de HRS truncado tal como se describe en la presente memoria.

- 5 Los expertos en la materia observarán que, a consecuencia de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de HRS tal como se describe en la presente memoria. Algunos de estos polinucleótidos pueden llevar una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen natural. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente dentro de la presente descripción, por ejemplo los polinucleótidos que están optimizados para
10 selección de codones humanos, de levaduras o de bacterias.

- Por tanto, múltiples polinucleótidos pueden codificar los polipéptidos de HRS de la presente descripción. Por otra parte, la secuencia de polinucleótidos puede manipularse por diversos motivos. Los ejemplos incluyen pero no son limitan a la incorporación de codones preferidos para mejorar la expresión del polinucleótido en diversos organismos
15 (véase en general Nakamura y col., *Nuc. Acid. Res.* 28 (1): 292, 2000). Además, pueden incorporarse mutaciones silenciosas para introducir, o eliminar sitios de restricción, reducir la densidad de motivos de dinucleótidos CpG (véase por ejemplo, Kameda y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349(4): 1269-1277, 2006) o reducir la capacidad de las secuencias monocatenarias de formar estructuras de tallo-bucle: (véase, por ejemplo, Zuker M., *Nucl. Acid Res.* 31(13): 3406-3415, 2003). Además, la expresión en mamíferos puede optimizarse además
20 incluyendo una secuencia de consenso de Kozak [es decir, (a/g)cc(a/g)ccATGg; SEQ ID NO: 130] en el codón de inicio. Las secuencias de consenso de Kozak útiles para este fin son conocidas en la técnica (Manty y col. *PNAS.* 92: 2662-2666, 1995; Mantyh y col., *Prot. Exp. & Purif.* 6,124, 1995). En la **Tabla D9** mostrada a continuación se proporcionan secuencias de polinucleótidos de ejemplo con optimización de codones.

Tabla D9			
Secuencias de ADN con optimización de codones			
Nombre	Residuo de aminoácidos Intervalo de SEQ ID NO: 1	Secuencia de ácidos nucleicos	SEQ ID NO:
Tipo no mutado (HisRS de longitud completa)	1-509	ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAACTTCA GGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGC GCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAACTCCTGAACT GAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTG TGCTCAAAACCCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGG CAGATGGCAGTTCGCGAGAAGGTGTTGACGTAATCATCCG TTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAATCATTGATACACCTGT ATTTGAACTAAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGGAAG ACTCCAAGCTTATCTATGACCTGAAGGACCAGGGCGGGGAG CTCCTGTCCCTTCGCTATGACCTCACTGTTCTTTTGCTCGGT ATTTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAACGCTACCAC ATAGCAAAGGTATATCGGCGGGATAACCCAGCCATGACCCG TGGCCGATACCGGGAATTCTACCAGTGTGATTTTGACATTGC TGGGAACTTTGATCCCATGATCCCTGATGCAGAGTGCCTGAA GATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCACCTCAGATAGGCGACTT CCTGGTCAAGGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGT TTGCTATCTGTGGTGTCTGACAGCAAGTTCCTGATCCATCT GCTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGGTGCTCTGGGAAGAG GTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGGCCTTGACCTGA GGTGGCTGACCGCATTGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTG GGGTATCCCTGGTGGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAAACTAT CCCCAAACAAGCAGGCCTTGGAGGGCCTGGGAGACCTGAAG TTGCTCTTTGAGTACCTGACCCTATTTGGCATTGATGACAAA ATCTCCTTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTAC ACTGGGGTGATCTATGAGGCAGTGCTGCTACAGACCCACAGC CCAGGCAGGGGAAGAGCCCCTGGGTGTGGGCAGTGTGGCTG CTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGCATGTTTCGACCCC AAAGGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGT GGAGCGGATTTTCTCCATCGTGGAACAGAGACTAGAGGCTT TGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTG GCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCT TGTCTCAGAACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGC TGTACAAGAAGAACCCAAAGCTACTGAACCAAGTTACAGTAC TGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATCGGCGA GCAGGAACTCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCAAGTGA CGAGCAGGGAAGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTG GAGGAAATCAAAAGGAGAACAGGCCAGCCCCTCTGCATCTG C	24
		GGTGGCTGACCGCATTGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTG GGGTATCCCTGGTGGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAAACTAT CCCCAAACAAGCAGGCCTTGGAGGGCCTGGGAGACCTGAAG TTGCTCTTTGAGTACCTGACCCTATTTGGCATTGATGACAAA ATCTCCTTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTAC ACTGGGGTGATCTATGAGGCAGTGCTGCTACAGACCCACAGC CCAGGCAGGGGAAGAGCCCCTGGGTGTGGGCAGTGTGGCTG CTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGCATGTTTCGACCCC AAAGGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGT GGAGCGGATTTTCTCCATCGTGGAACAGAGACTAGAGGCTT TGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTG GCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCT TGTCTCAGAACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGC TGTACAAGAAGAACCCAAAGCTACTGAACCAAGTTACAGTAC TGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATCGGCGA GCAGGAACTCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCAAGTGA CGAGCAGGGAAGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTG GAGGAAATCAAAAGGAGAACAGGCCAGCCCCTCTGCATCTG C	
HisRS1 ^{N1}	1-141	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAACTGCTGAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCTCTGTC AATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTGCTG CTTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTT TGAGCTGAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACA GCAAACTGATTTATGACCTGAAAGATCAGGGTGGTGAAGT CTGAGTCTGCGCTATGATCTGACAGTTCCGTTTGGCCGTAT CTGGCAATG	25

HisRS1 ^{N2}	1-408	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACCTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACCTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCA AATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTTCGACGTGATCATTTCGTG CTTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTT TGAGCTGAAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACA GCAAACCTGATTTATGACCTGAAAGATCAGGGTGGTGAAGT CTGAGTCTGCGCTATGATCTGACAGTTCCGTTTGCCCGTTAT CTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAAACGCTATCACAT TGCTAAAGTCTATCGCCGTGACAATCCTGCTATGACCCGTGG TCGTTATCGTGAGTTCTATCAGTGTGACTTCGATATTGCCGG CAACTTTGATCCGATGATCCCGGATGCTGAATGCCTGAAAAT CATGTGTGAGATCCTGAGCAGTCTGCAGATTGGCGATTTCT GGTGAAAAGTCAACGATCGCCGTATTCTGGATGCGATGTTTCG CATCTGTGGTGTTAGCGACTCCAAATTCCGTACCATCTGTAG TAGTGTGGACAACTGGATAAAGTGAGCTGGGAGGAGGTGA AAAACGAAATGGTGGGCGAGAAAGGTCTGGCTCCTGAAGTG GCTGACCGTATTGGTGATTATGTCCAGCAGCACGGTGGAGT ATCACTGGTTGAGCAACTGCTGCAAGACCCTAAACTGAGTC AGAATAAACAGGCCCTGGAGGGACTGGGAGATCTGAAACTG CTGTTTCGAGTATCTGACCCTGTTCCGTATCGATGACAAAATC TCCTTTGACCTGTCACTGGCTCGTGGACTGGACTATTATACC GGCGTGATCTATGAAGCTGTACTGCTGAAAACCTCCAGCACA AGCAGGTGAAGAGCCTCTGGGTGTGGGTAGTGTAGCCCGTG GGGGACGTTATGATGGACTGGTGGGGATGTTTCGACCCTAAA GGCCGTAAAGTTCCGTGTGTGGGTCTGAGTATCGGTGTTGAG CGTATCTTTTCCATCGTCGAGCAACGTCTGGAAGCACTGGAG GAAAAAATCCGTACGACCGAA	26
HisRS1 ^{N3}	1-113	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACCTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACCTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCA AATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTTCGACGTGATCATTTCGTG CTTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTT TGAGCTGAAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACA GCAAACCTG	27
HisRS1 ^{N4}	HRS(1-60)	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACCTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACCTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCA	28

HisRS1 ^{NB}	HRS(1-506)	ATGGCAGAGCGTGC GGCGCTGGAGGAGCTGGTGAACTTCA GGGAGAGCGCGTGC GAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGC GCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACT GAAGGCACAGCTGGGTCCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTG TGCTCAAAACCCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGG CAGATGGCAGTTCGCGAGAAGGTGTTTGACGTAATCATCCG TTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAATCATTGATACACCTGT ATTTGAACTAAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGGAAG ACTCCAAGCTTATCTATGACCTGAAGGACCAGGGCGGGGAG CTCCTGTCCCTTCGCTATGACCTCACTGTTCTTTTGCTCGGT ATTTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAAACGCTACCAC ATAGCAAAGGTATATCGGCGGGATAACCCAGCCATGACCCG TGGCCGATACCGGGAATTCTACCAGTGTGATTTTGACATTGC TGGGAACTTTGATCCCATGATCCCTGATGCAGAGTGCCTGAA GATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCATTTCAGATAGGCGACTT CCTGGTCAAGGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGT TTGCTATCTGTGGTGTCTGACAGCAAGTTCCTGATCCATCT GCTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGGTGTCCTGGGAAGAG GTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGGCCTTGACCTGA GGTGGCTGACCGCATTGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTG GGGTATCCCTGGTGGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAAACTAT CCCAAAACAAGCAGGCCTTGGAGGGCCTGGGAGACCTGAAG TTGCTCTTTGAGTACCTGACCCTATTTGGCATTGATGACAAA ATCTCCTTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTAC ACTGGGGTGATCTATGAGGCAGTGCTGCTACAGACCCACG CCAGGCAGGGGAAGAGCCCCTGGGTGTGGGCAGTGTGGCTG CTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGCATGTTCCGACCC AAAGGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGT GGAGCGGATTTTCTCCATCGTGGAACAGAGACTAGAGGCTT TGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTG GCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCT TGTCTCAGAACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGC TGTACAAGAAGAACCACAAAGCTACTGAACCAAGTTACGATAC TGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATCGGCGA GCAGGAACTCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCACTGA CGAGCAGGGAAGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTG GAGGAAATCAAAAGGAGAAACAGGCCAGCCCTC	72
HisRS1 ^{NB}	HRS(1-48)	ATGGCAGAACGTGCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGAT	73
HisRS1 ^{II}	191-333	TGCTTGAAATCATGTGTGAGATCCTGAGTAGTCTGCAAAAT GGCGACTTTCTGGTCAAAGTGAACGATCGCCGATTTCTGGAT GGCATGTTCCGCATCTGTGGTGTAGCGACTCCAAATTCCTG ACAATCTGTAGCAGCGTGGACAAACTGGATAAAGTGTCTCTG GGAAGAGGTGAAAAACGAAATGGTGGGTGAAAAAGGTCTG GCTCCGGAGGTTGCTGACCGTATCGGTGATTATGTTTCAGCAG CACGGCGGTGTAGTCTGGTTGAACAAGTCTGCAAGACCC GAAACTGTCTCAGAACAAACAGGCCCTGGAAGGACTGGGAG ATCTGAAACTGCTGTTCGAGTATCTGACGCTGTTCCGGCATTG ATGACAAAATTTCTTTCGACCTGTCACCTGGCACGTGGACTGG ACTATTATACCGGT	29
HisRS1 ^{CI}	405-509	CGTACCACCGAAACCCAAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAA AAACTGCTGGAAGAACGCCTGAAACTGGTTAGCGAACTGT GGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAC CCGAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGG TATTCCTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAG ACGGCGTTATTAAACTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAA GTTGACGTTCCCGTGAAGATCTGGTTCGAGGAAATCAAACG TCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTTC	30

HisRS1 ^{N5}	1-243 + 27aa	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCA AATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTTCGTG CTTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTT TGAGCTGAAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACA GCAAACTGATCTATGACCTGAAAGACCAAGGCCGTGAACTG CTGTCCCTGCGTTATGATCTGACTGTGCCGTTTGCCCGTTATC TGGCCATGAATAAACTGACGAACATTAAACGCTATCACATT GCCAAAGTGATCGCCGTGACAATCCTGCTATGACTCGTGGA CGTTATCGTGAATTCTATCAGTGTGACTTCGATATTGCCCGC AACTTCGACCCTATGATTCCGGATGCTGAATGCCTGAAAATC ATGTGTGAGATCCTGAGCAGCCTGCAAAATGGTGACTTCCTG GTGAAAGTGAATGACCGTCGTATCCTGGATGGCATGTTTGCC ATTTGTGGTGTGAGCGATTCCAAATTCCTGACCATCTGTAGT AGTGTGGACAACTGGATAAAGTGGGCTATCCGTGGTGGA CTCTTGTAGCCGTATTCTGAACTATCCTAAAACCAGCCGCC GTGGCGTGCTTGGGAACT	31
HisRS1 ^{C2}	1-60 + 175-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAAGACTTCGATATTGCCGGGAATTTTGA CCCTATGATCCCTGATGCCGAATGTCTGAAAATCATGTGTGA GATCCTGAGCAGTCTGCAGATTGGTGACTTCCTGGTGAAAGT GAACGATCGCCGTATTCTGGATGGAATGTTTGCCATTTGTGG CGTGTCTGACAGCAAATTTTCGTACGATCTGTAGCAGCGTGGA TAAACTGGATAAAGTGAGCTGGGAGGAGGTGAAAAATGAG ATGGTGGGCGAAAAAGGTCTGGCACCTGAAGTGGCTGACCG TATCGGTGATTATGTTTCAGCAACATGGCGGTGTTTCTCTGGT CGAACAGCTGCTGCAAGACCCAAAACTGAGCCAGAACAAC AGGCACTGGAAGGACTGGGTGATCTGAAACTGCTGTTTGAG TATCTGACGCTGTTTGGCATCGATGACAAAATCTCGTTTGAC CTGAGCCTGGCACGTGGTCTGGATTATTATACCGGCGTGATC TATGAAGCCGTCCTGCTGCAAACTCCAGCACAAGCAGGTGA AGAACCTCTGGGTGTTGGTAGTGTAGCGGCAGGCGGACGTT ATGATGGACTGGTGGGGATGTTTGATCCGAAAGGCCGTAAA GTTCCGTGTGTGGTCTGAGTATCGGGGTTGAGCGTATCTTT AGCATTGTGGAGCAACGTCTGGAAGCTCTGGAGGAAAAAAT CCGTACCACCGAAACCCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAA AAAACTGCTGGAAGAACGCCTGAACTGGTTAGCGAACTGT GGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAC CCGAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGG TATTCCTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAG ACGGCGTTATTAACTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAA GTTGACGTTCCCGTGAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACG TCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTTC	32

HisRS1 ^{C3}	1-60 + 211-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCTGTTCTGAAACAGCAGAAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAAGTGAATGATCGCCGTATCCTGGATG GCATGTTTGCCATTTGTGGTGTGAGCGACTCGAAATTCCGTA CGATTTGCTCTAGCGTCGATAAACTGGACAAAGTGTCTGGG AAGAGGTGAAAAACGAGATGGTGGGTGAGAAAAGGTCTGGC TCCTGAAGTTGCCGACCGTATTGGTGATTATGTTTCAGCAGCA TGGCGGTGTTTCACTGGTTGAACAACCTGCTGCAAGACCCGA AACTGTCTCAGAATAAACAGGCGCTGGAAGGACTGGGAGAT CTGAAACTGCTGTTTGAGTATCTGACCCTGTTCCGGCATTGAT GACAAAATCAGCTTCGACCTGAGCCTGGCACGTGGTCTGGA TTATTATACCGGCGTGATCTATGAAGCCGTTCTGCTGCAGAC ACCAGCACAAGCAGGCGAAGAACCTCTGGGTGTTGGTTCTG TGGCAGCCGGTGGTCTGTTATGATGGACTGGTAGGCATGTTTCG ATCCGAAAAGGCCGTAAAGTTCCGTGTGTGGGACTGAGTATC GGTGTGAGCGTATCTTTAGCATCGTGAACAACGTCTGGAA GCGCTGGAGGAGAAAATTTCGTACCACCGAAACCCAAGTTCT GGTTGCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAAGAACGCCTGA AACTGGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCATTAAAGCCGAA CTGCTGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGAATCAGCTGCA GTATTGTGAGGAAGCGGGTATTCTCTGGTGGCCATTATCGG AGAACAGGAACTGAAAGACGGCGTTATTAACCTGCGTAGCG TGACCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCCCGTGAAGATCTGG TCGAGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTT GC	33
HisRS1 ^{C4}	1-100 + 211-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCTGTTCTGAAACAGCAGAAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAAGGAACTCGTGATTATAGCCCTCGCC AGATGGCTGTCCGTGAAAAAGTGTTCGATGTGATCATTCGCT GCTTCAAACGTCATGGTGCCGAAGTCATTGATACCCCGGTGT TCGAGCTGAAAGTGAACGATCGCCGTATTCTGGATGGCATG TTCGCCATTTGTGGTGTTAGCGATAGCAAATTCGGTACAATC TGCTCTAGCGTGGAACAACTGGACAAAGTGAGCTGGGAAGA GGTGAAAAACGAGATGGTGGGTGAGAAAAGGCTGGCTCCTG AAGTTGCCGACCGTATCGGAGATTATGTTTCAGCAGCATGGC GGAGTTTCACTGGTTGAACAACCTGCTGCAAGACCCGAAACT GTCTCAGAACAAACAGGCACTGGAAGGTCTGGGAGATCTGA AACTGCTGTTTCGAGTATCTGACGCTGTTCCGTATTGACGACA AAATTTCTTCGACCTGTCGCTGGCACGTGGTCTGGATTATT ATACAGGCGTGATCTATGAGGCTGTACTGCTGCAGACACCA GCACAAGCAGGTGAAGAGCCTCTGGGTGTTGGTTCAAGTTGC TGCCGTTGGACGTTATGACGGAAGTGGTAGGGATGTTTGACC CAAAAGGCCGTAAAGTCCCGTGTGTAGGACTGTCTATTGGC GTTGAGCGTATCTTTAGCATCGTGGAGCAACGTCTGGAAGCT CTGGAGGAGAAAATCCGTACCACCGAAACCCAAGTTCTGGT TGCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAAGAACGCCTGAAAC TGGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACTG CTGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTA TTGTGAGGAAGCGGGTATTCTCTGGTGGCCATTATCGGAGA ACAGGAACTGAAAGACGGCGTTATTAACCTGCGTAGCGTGA CCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCCCGTGAAGATCTGGTCG AGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTTGC	34

HisRS1 ^{C5}	1-174+ 211-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACCTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGGAACTCGTGATTATAGCCCTCGCC AGATGGCTGTCCGTGAAAAAGTGTTCGATGTGATCATTGCT GCTTCAAACGTCATGGTGCCGAAGTCATTGATACCCCGGTGT TCGAGCTGAAAGAAACCCCTGATGGGCAAATATGGGGAAGAT TCCAAACTGATCTATGACCTGAAAGACCAGGGAGGTGAACT GCTGTCTCTGCGCTATGACCTGACTGTTCCCTTTTGCTCGCTAT CTGGCCATGAATAAACTGACCAACATCAAACGCTATCATAT CGCCAAAGTGTATCGCCGTGACAATCCAGCAATGACCCGTG GTCGTTATCGTGAATTTTATCAGTGTGTGAACGATCGCCGTA TTCTGGACGGCATGTTCCGCATTTGTGGTGTGTCTGACTCCA AATTTCTGACGATCTGCTCAAGCGTGGACAACTGGACAAA GTGAGCTGGGAAGAGGTGAAAAACGAGATGGTGGGTGAGA AAGGCCTGGCTCCTGAAGTTGCCGACCGTATCGGAGATTAT GTTTCAGCAGCATGGCGGAGTTTCACTGGTTGAACAACTGCTG CAAGACCCGAAACTGTACAGAACAAACAGGCACTGGAAG GTCTGGGGGATCTGAAACTGCTGTTTCGAGTATCTGACGCTGT TCGGTATTGACGACAAAAATCAGCTTCGATCTGAGCTGGCAC GTGGTCTGGACTATTATACCGGCGTGATTTATGAAGCCGTTT TGCTGCAGACTCCAGCACAAGCAGGTGAAGAGCCTCTGGGT GTTGGAAGTGTGGCAGCCGGTGGCCGTTATGATGGTCTGGTT GGCATGTTTGACCCGAAAGGCCGTAAAGTCCCGTGTGTAGG ACTGTCTATCGGCGTGGAGCGTATTTTATGATCTGTGGAACA ACGCCCTGGAAGCTCTGGAAGAGAAAAATCCGTACCACCGAAA CCCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAA GAACGCCTGAAACTGGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCAT TAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGA ATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGGTATTCTCTGGTGG CCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAGACGGCGTTATTAA CTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCCGCCGT GAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACC TCTGTGATTTC	35
HisRS1 ^{C6}	1-60+101-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACCTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGAAACCCCTGATGGGCAAATATGGCG AAGATTCCAAACTGATCTATGACCTGAAAGACCAAGGCGGT GAACTGCTGTCCCTGCGTTATGACCTGACTGTTCCGTTTGCT CGTTATCTGGCCATGAATAAACTGACCAACATTAACGCTAT CACATTGCCAAAAGTGTATCGCCGTGACAATCCTGCTATGACT CGTGGACGTTATCGTGAATTCTATCAGTGTGACTTCGATATT GCCGGCAACTTCGACCCTATGATTCCGGATGCTGAATGCCTG AAAATCATGTGTGAGATCCTGAGCAGCCTGCAAAATTGGTGA CTTCCTGGTGAAAGTGAATGACCGTCGTATCCTGGATGGCAT GTTTCGCCATTTGTGGTGTAGCGATTCCAAATTCCGTACCAT CTGTAGTAGTGTGGACAAACTGGATAAAGTGAGCTGGGAAG AGGTGAAAAACGAAATGGTGGGCGAAAAAGGTCTGGCACCT GAGGTGCTGATCGTATCGGTGACTATGTCCAGCAGCATGG AGGTGTTTCACTGGTTGAGCAACTGCTGCAAGATCCGAAACT GTCTCAGAACAAACAGGCCCTGGAAGGACTGGGTGATCTGA AACTGCTGTTTCGAGTATCTGACGCTGTTTCGGTATTGATGACA AAATCTCGTTTCGACCTGTCTCTGGCTCGTGGACTGGATTATT ATACGGGCGTAATCTATGAAGCTGTCCTGCTGCAGACACCA GCACAAGCAGGTGAAGAGCCTCTGGGTGTTGGAAGTGTTC TGCCGGTGGTCGCTATGACGGACTGGTTGGCATGTTTCGATCC GAAAGGCCGTAAAGTTCGTTGTGTAGGACTGAGCATTGGCG	36

		TTGAGCGTATCTTTTCCATCGTTGAGCAACGTCCTGGAAGCAC TGGAAGAGAAAAATCCGTACCACCGAAACCCAAAGTTCTGGTT GCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAAGAACGCCTGAAACT GGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACGTC TGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTAT TGTGAGGAAGCGGGTATTCTCTGGTGGCCATTATCGGAGA ACAGGAACTGAAAGACGGCGTTATTAAGCTGCGTAGCGTGA CCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCCGCGTGAAGATCTGGTCG AGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTTC ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGGAACTCGTGATTATAGCCCTCGCC AGATGGCTGTCCGTGAAAAAGTGTTCGATGTGATCATTGCT GCTTCAAACGTCATGGTGCCGAAGTCATTGATACCCCGGTGT TCGAGCTGAAAGATTTCGATATTGCCGGCAACTTTGATCCGA TGATTCCGGATGCTGAGTGTCTGAAAATCATGTGTGAGATCC TGAGTAGTCTGCAGATTGGGGATTTCTGGTGAAGTGAAC GATCGCGTATTCTGGACGGCATGTTTGCCATTTGTGGCGTT AGCGATAGCAAATTCCGTACGATCTGTAGCAGTGTGGACAA ACTGGATAAAGTCTCTTGGGAAGAGGTCAAAAACGAGATGG TTGGTGAGAAAGGCCCTGGCTCCTGAAGTGGCTGACCGTATT GGTGATTATGTCCAGCAGCATGGTGGTGTTCCTGCTGTTGAA CAACTGCTGCAAGACCCGAAACTGTCTCAGAACAAACAGGC ACTGGAAGGTCTGGGTGATCTGAAACTGCTGTTCGAGTATCT GACGCTGTTCCGTATTGACGACAAAAATTTCTTCGACCTGTC ACTGGCACGTGGTCTGGATTATTATACAGGCGTAATCTATGA GGCTGTACTGCTGCAAACTCCAGCACAAAGCAGGTGAAGAAC CTCTGGGAGTTGGTAGTGTAGCGGCAGGGGGTCTGTTATGAT GGGCTGGTGGGATGTTGATCCAAAAGGCCGTAAAGTCCC GTGTGTTGGTCTGTCTATTGGCGTTGAGCGTATCTTCTCCATC GTGGAGCAACGTCTGGAAGCTCTGGAAGAAAAAATCCGTAC CACCGAAACCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAAAAAAC TGCTGGAAGAACGCCGTGAAACTGGTTAGCGAACTGTGGGAT GCTGGCATTAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGAA ACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGGTATTC CTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAAGTGAAGACGGC GTTATTAAGCTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAAGTTGAC GTTCGCCGTGAAGATCTGGTTCGAGGAAATCAAACGTCGTAC CGGTCAACCTCTGTGTATTTC	
HisRS1 ^{C7}	1-100 + 175-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGGAACTCGTGATTATAGCCCTCGCC AGATGGCTGTCCGTGAAAAAGTGTTCGATGTGATCATTGCT GCTTCAAACGTCATGGTGCCGAAGTCATTGATACCCCGGTGT TCGAGCTGAAAGATTTCGATATTGCCGGCAACTTTGATCCGA TGATTCCGGATGCTGAGTGTCTGAAAATCATGTGTGAGATCC TGAGTAGTCTGCAGATTGGGGATTTCTGGTGAAGTGAAC GATCGCGTATTCTGGACGGCATGTTTGCCATTTGTGGCGTT AGCGATAGCAAATTCCGTACGATCTGTAGCAGTGTGGACAA ACTGGATAAAGTCTCTTGGGAAGAGGTCAAAAACGAGATGG TTGGTGAGAAAGGCCCTGGCTCCTGAAGTGGCTGACCGTATT GGTGATTATGTCCAGCAGCATGGTGGTGTTCCTGCTGTTGAA CAACTGCTGCAAGACCCGAAACTGTCTCAGAACAAACAGGC ACTGGAAGGTCTGGGTGATCTGAAACTGCTGTTCGAGTATCT GACGCTGTTCCGTATTGACGACAAAAATTTCTTCGACCTGTC ACTGGCACGTGGTCTGGATTATTATACAGGCGTAATCTATGA GGCTGTACTGCTGCAAACTCCAGCACAAAGCAGGTGAAGAAC CTCTGGGAGTTGGTAGTGTAGCGGCAGGGGGTCTGTTATGAT GGGCTGGTGGGATGTTGATCCAAAAGGCCGTAAAGTCCC GTGTGTTGGTCTGTCTATTGGCGTTGAGCGTATCTTCTCCATC GTGGAGCAACGTCTGGAAGCTCTGGAAGAAAAAATCCGTAC CACCGAAACCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAAAAAAC TGCTGGAAGAACGCCGTGAAACTGGTTAGCGAACTGTGGGAT GCTGGCATTAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGAA ACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGGTATTC CTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAAGTGAAGACGGC GTTATTAAGCTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAAGTTGAC GTTCGCCGTGAAGATCTGGTTCGAGGAAATCAAACGTCGTAC CGGTCAACCTCTGTGTATTTC	37
HisRS1 ^{C10}	369-509	ATGTTTCGACCCAAAAGGCCGTAAAGTTCCGTGTGTAGGGCT GTCTATCGGTGTTGAGCGTATCTTCTCCATCGTTGAGCAGCG TCTGGAAGCACTGGAGGAAAAAATCCGTACGACCGAGACTC AAGTCTGGTTGCTAGTGCCAGAAAAAACTGCTGGAAGAG CGCTGAAACTGGTTAGTGAGCTGTGGGATGCCGGTATTAA AGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGAACTGCTGAATC AGCTGCAGTATTGTGAAGAAGCGGGCATTCCGCTGGTAGCG ATTATCGGGGAACAAGAACTGAAAGATGGCGTGATCAAACT GCGTAGCGTTACAAGCCGTGAGGAAGTGGACGTCCGCCGTG AGGATCTGGTTGAAGAGATTAAACGCCGTACAGGTACGCCT CTGTGTATTTC	38

En un polinucleótido de la presente descripción pueden estar presentes, pero no necesariamente, secuencias codificantes o no codificantes adicionales, y un polinucleótido puede estar ligado, pero no necesariamente, a otras moléculas y/o materiales de soporte. Por ello, los polinucleótidos de la presente descripción, con independencia de la longitud de la secuencia codificante en sí, pueden combinarse con y acoplarse operativamente con otras secuencias de ADN o ARN, tales como secuencias de control de expresión, que incluyen por ejemplo, promotores, señales de poliadenilación. Además, los polinucleótidos pueden comprender además sitios de enzimas de restricción, múltiples sitios de clonación, otros segmentos codificantes y similares, de manera que su longitud global puede variar considerablemente.

10

Por tanto se contempla que puede emplearse un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud; estando la longitud total limitada preferentemente por la facilidad de preparación y el uso en el protocolo de ADN

recombinante pretendido. Se incluyen polinucleótidos de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 270, 280, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.100, 2.200, 2.300, 2.400, 2.500, 2.600, 2.700, 2.800, 2.900, 3.000 o más (que incluye todos los números enteros intermedios) bases de longitud, lo que incluye cualquier porción o fragmento (por ejemplo, mayor de aproximadamente 6, 7, 8, 9 ó 10 nucleótidos de longitud) de un polinucleótido de HRS de referencia (por ejemplo, número de base X-Y, donde X es aproximadamente 1-3.000 o más e Y es aproximadamente 10-3.000 o más), o su complemento.

10

Las realizaciones de la presente descripción incluyen también "variantes" de secuencias de polipéptidos de referencia que codifican polipéptidos de HRS. Las "variantes" de polinucleótidos pueden contener una o más sustituciones, adiciones, delecciones y/o inserciones en relación con un polinucleótido de referencia. En general, las variantes de una secuencia de polinucleótidos de referencia de polipéptidos de HRS pueden tener al menos aproximadamente el 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, en general al menos aproximadamente el 75%, 80%, 85%, de forma conveniente aproximadamente el 90% a 95% o más, y de forma más adecuada aproximadamente el 98% o más de identidad de secuencias con dicha secuencia de nucleótidos en particular (tal como por ejemplo, las SEQ ID NO: 24-38, 40, 42, 72-73, 173-175 ó 183-189) según se determina mediante programas de alineación de secuencias descritos en otro lugar en la presente memoria usando parámetros por omisión. En algunas realizaciones de la presente descripción, las variantes pueden diferir de una secuencia de referencia en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100 (que incluye todos los números enteros intermedios) o más bases. En algunas realizaciones de la presente descripción, tales como cuando la variante de polinucleótido codifica un polipéptido de HRS que tiene una actividad no canónica, la actividad deseada del polipéptido de HRS codificado no disminuye sustancialmente con respecto al polipéptido no modificado. El efecto en la actividad del polipéptido codificado puede valorarse en general tal como se describe en la presente memoria, lo que incluye por ejemplo los procedimientos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones de la presente descripción, las variantes pueden modificar el estado de agregación de los polipéptidos de HRS, por ejemplo, para proporcionar polipéptidos de HRS que existen en diferentes realizaciones principalmente en forma de monómero, dímero o multímero.

30

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen polinucleótidos que se hibridan con una secuencia de polinucleótidos de HRS de referencia (tales como por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NO: 24-38, 40, 42, 72-73, 173-175 ó 183-189) o con sus complementos, en condiciones de astringencia descritas más adelante. Tal como se usa en la presente memoria, el término "se hibrida en condiciones de astringencia baja, astringencia media, astringencia alta o astringencia muy alta" describe condiciones de hibridación y lavado. Pueden encontrarse orientaciones para realizar reacciones de hibridación en Ausubel y col., (1998, más arriba), secciones 6.3.1-6.3.6. En dicha referencia se describen procedimientos acuosos y no acuosos, pudiéndose usarse ambos.

35

La referencia en la presente memoria a condiciones de astringencia baja incluyen y comprenden de al menos aproximadamente el 1% v/v a al menos aproximadamente el 15% v/v de formamida y de sal al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M para hibridación a 42°C, y de sal al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M para lavado a 42°C. Las condiciones de astringencia baja también pueden incluir albúmina de suero bovino (BSA) al 1%, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7% para hibridación a 65°C, y (i) 2 × SSC, SDS al 0,1%; o (ii) BSA al 0,5%, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM (pH 7,2), SDS al 5% para lavado a temperatura ambiente. Una realización de la presente descripción de condiciones de astringencia baja incluye hibridación en 6 × cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por dos lavados en 0,2 × SSC, SDS al 0,1% al menos a 50°C (la temperatura de los lavados puede aumentarse a 55°C para condiciones de astringencia baja).

50

Las condiciones de astringencia media incluyen y comprenden de al menos aproximadamente el 16% v/v a al menos aproximadamente el 30% v/v de formamida y de sal al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M para hibridación a 42°C, y de sal al menos aproximadamente 0,1 M a al menos aproximadamente 0,2 M para lavado a 55°C. Las condiciones de astringencia media también pueden incluir albúmina de suero bovino (BSA) al 1%, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7% para hibridación a 65°C, y (i) 2 × SSC, SDS al 0,1%; o (ii) BSA al 0,5%, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM (pH 7,2), SDS al 5% para lavado a 60-65°C. Una realización de la presente descripción de condiciones de astringencia media incluye la hibridación en 6 × SSC a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2 × SSC, SDS al 0,1% a 60°C. Las condiciones de astringencia alta incluyen y comprenden de al menos aproximadamente el 31% v/v a al menos aproximadamente el 50% v/v de formamida y sal de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 0,15 M para hibridación a 42°C, y sal de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 0,02 M para lavado a 55°C.

60

- Las condiciones de astringencia alta también pueden incluir BSA al 1%, EDTA 1 mM, NaHPO_4 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7% para hibridación a 65°C, y (i) 0,2 × SSC, SDS al 0,1%; o (ii) BSA al 0,5%, EDTA 1 mM, NaHPO_4 40 mM (pH 7,2), SDS al 1% para lavado a una temperatura superior a 65°C. Una realización de la presente descripción de
- 5 condiciones de astringencia alta incluye hibridación en 6 × SSC a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2 × SSC, SDS al 0,1% a 65°C. Una realización de la presente descripción de condiciones de astringencia muy alta incluye la hibridación en fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7% a 65°C, seguido por uno o más lavados en 0,2 × SSC, SDS al 1% a 65°C.
- 10 Otras condiciones de astringencia son bien conocidas en la técnica y un experto en la materia reconocerá que pueden manipularse varios factores para optimizar la especificidad de la hibridación. La optimización de la astringencia de los lavados finales puede servir para garantizar un alto grado de hibridación. Pueden consultarse ejemplos detallados en Ausubel y col., más arriba en las páginas 2.10.1 a 2.10.16 y en Sambrook y col. (1989, más arriba) en las secciones 1.101 a 1.104. Aunque los lavados de astringencia se realizan normalmente a temperaturas
- 15 de 42°C a 68°C, un experto en la materia apreciará que pueden ser adecuadas otras temperaturas para condiciones de astringencia. La velocidad de hibridación máxima tiene lugar normalmente a aproximadamente entre 20°C y 25°C por debajo de la T_f para la formación de un híbrido ADN-ADN. En la técnica se sabe bien que la T_f es la temperatura de fusión, o temperatura a la cual se disocian secuencias de polinucleótidos complementarias. Los procedimientos para estimar la T_f son bien conocidos en la técnica (véase Ausubel y col., más arriba en página 2.10.8).
- 20 En general, la T_f de un dúplex de ADN perfectamente emparejado puede predecirse como una aproximación mediante la fórmula: $T_f = 81,5 + 16,6 (\log_{10} M) + 0,41 (\%G+C) - 0,63 (\% \text{ formamida}) - (600/\text{longitud})$ donde: M es la concentración de Na^+ , preferentemente en el intervalo de 0,01 molar a 0,4 molar; %G+C es la suma de bases guanosina y citosina como un porcentaje del número total de bases, en el intervalo entre el 30% y el 75% G+C; %
- 25 formamida es el % de concentración de formamida en volumen; longitud es el número de pares de bases en el dúplex de ADN. La T_f de un dúplex de ADN disminuye aproximadamente en 1°C con cada aumento del 1% en el número de pares de bases aleatoriamente no emparejados. El lavado se lleva a cabo en general una $T_f - 15^\circ\text{C}$ para astringencia alta, o $T_f - 30^\circ\text{C}$ para astringencia moderada.
- 30 En un ejemplo de un procedimiento de hibridación, a membrana (por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa o una membrana de nailon) que contiene ADN inmovilizado que se hibrida durante toda la noche a 42°C en un tampón de hibridación (formamida desionizada al 50%, 5 × SSC, 5 × solución de Denhardt (0,1% ficoll, 0,1% polivinilpirrolidona y albúmina de suero bovino al 0,1%), SDS al 0,1% y 200 mg/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado) que contiene una sonda etiquetada. La membrana se somete a continuación a dos lavados en secuencia de
- 35 astringencia media (es decir, 2 × SSC, SDS al 0,1% durante 15 min a 45°C, seguido por 2 × SSC, SDS al 0,1% durante 15 min a 50°C), seguido por dos lavados en secuencia de astringencia superior (es decir, 0,2 × SSC, SDS al 0,1% durante 12 min a 55°C seguido por 0,2 × SSC y solución de SDS al 0,1% durante 12 min a 65-68°C).

Producción de polipéptidos de HRS

- 40 El polipéptido de HRS puede prepararse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido para los expertos en la materia, por ejemplo, usando síntesis de péptidos en fase sólida estándar (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963)), o por tecnología recombinante usando un hospedador modificado genéticamente. La síntesis de proteínas puede realizarse usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede
- 45 conseguirse, por ejemplo, usando Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Alternativamente, varios fragmentos pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando procedimientos químicos para producir la molécula deseada.
- Los polipéptidos de HRS pueden producirse también mediante la expresión de una secuencia de ADN que codifica
- 50 el polipéptido de HRS en cuestión en una célula hospedadora adecuada por técnicas bien conocidas. La secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido de HRS puede prepararse sintéticamente mediante procedimientos estándar establecidos, por ejemplo, el procedimiento de fosfoamidita descrito por Beaucage y col. (1981) *Tetrahedron Letters* 22:1859-1869, o el procedimiento descrito por Matthes y col. (1984) *EMBO Journal* 3:801-805. De acuerdo con el procedimiento de fosfoamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador
- 55 de ADN automático, se purifican, se duplican y se ligan para formar la construcción de ADN sintético. Alternativamente la construcción de ADN puede construirse usando técnicas estándar de biología molecular recombinante que incluyen clonación mediada por enzimas de restricción y amplificación génica basada en PCR.
- Las secuencias de polinucleótidos pueden ser también de ADNc genómico mixto, y de origen sintético. Por ejemplo,
- 60 una secuencia genómica o de ADNc que codifica un péptido delantero puede unirse con una secuencia genómica o de ADNc que codifica el polipéptido de HRS, después de lo cual la secuencia de ADN puede modificarse en el sitio

insertando oligonucleótidos sintéticos que codifican la secuencia de aminoácidos deseada o por PCR usando oligonucleótidos adecuados. En algunas realizaciones de la presente descripción puede incluirse una secuencia de señal antes de la secuencia codificante. Esta secuencia codifica un péptido de señal en el extremo N en la secuencia codificante que se comunica con la célula hospedadora para dirigir el polipéptido a la superficie celular o secretar el polipéptido en el medio. Normalmente el péptido de señal es cortado por la célula hospedadora antes de que la proteína salga de la célula. Los péptidos de señal pueden encontrarse en diversas proteínas en procariotas y eucariotas.

Se conocen diversos sistemas de vectores de expresión/hospedador y pueden usarse para contener y expresar secuencias de polinucleótidos. Entre ellos se incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriógenos, plásmicos o cósmidos recombinantes; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión víricos (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión víricos (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos pBR322 o Ti); o sistemas de células animales, que incluyen sistemas de células de mamíferos y más específicamente sistemas de células humanas transformados con vectores de expresión de virus, plásmidos, episomas o de integración.

Dichos vectores de expresión pueden comprender secuencias de control de expresión, que incluyen por ejemplo, potenciadores, promotores, regiones no traducidas en 5' y 3', que interactúan con proteínas celulares hospedadoras para realizar la transcripción y la traducción. Dichos elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema de vectores y del hospedador usado, puede usarse cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, que incluyen promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clonan en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como el promotor lacZ híbrido del fagémido PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.) o el plásmido PSPO1 (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) y similares. En sistemas de células de mamíferos, se prefieren en general los promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Si es necesario generar una línea celular que contiene múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, pueden usarse ventajosamente vectores basados en SV40 o EBV con un marcador seleccionable apropiado.

Algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear sistemas de expresión basados en *E. coli* (véase, por ejemplo, Structural Genomics Consortium y col., *Nature Methods*. 5:135-146, 2008). Estas y otras realizaciones relacionadas de la presente descripción pueden basarse parcial o totalmente en la clonación independiente de la ligadura (LIC) para producir un vector de expresión adecuado. En realizaciones específicas de la presente descripción, la expresión de proteínas puede controlarse mediante una ARN polimerasa T7 (por ejemplo, serie de vectores pET). Estas y otras realizaciones relacionadas de la presente descripción pueden usar la cepa de hospedador de expresión BL21 (DE3), un lisógeno λ DE3 de BL21 que soporta la expresión mediada por T7 y es deficiente en las proteasas lon y ompT para una mejora en la estabilidad de la proteína diana. Se incluyen también cepas de hospedador de expresión que llevan plásmidos que codifican tRNA usados raras veces en *E. coli*, tales como las cepas ROSETTA™ (DE3) y Rosetta 2 (DE3). En algunas realizaciones de la presente descripción pueden usarse otras cepas de *E. coli*, que incluyen otras cepas K-12 de *E. coli* tales como W3110 (F' lambda EN(rrnD-rrnE)1 rph-1), que pueden producir niveles reducidos de modificaciones postraduccionales durante la fermentación. La lisis celular y el manejo de las muestras también pueden mejorarse usando reactivos comercializados con las marcas BENZONASE® nucleasa y reactivo de extracción de proteínas BUGBUSTER®. Para el cultivo celular, los medios de autoinducción pueden mejorar la eficiencia de muchos sistemas de expresión, que incluyen sistemas de expresión de alto rendimiento. Los medios de este tipo (por ejemplo, OVERNIGHT EXPRESS™ Autoinduction System) activan gradualmente la expresión de proteínas a través del desplazamiento metabólico sin el añadido de agentes de inducción artificiales tales como IPTG.

Algunas realizaciones particulares de la presente descripción emplean etiquetas de hexahistidina, u otras etiquetas de afinidad o purificación, seguido por purificación por cromatografía de afinidad metálica inmovilizada (IMAC), o técnicas relacionadas. En algunos aspectos de la presente descripción, sin embargo, pueden aislarse proteínas de calidad clínica a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli*, con o sin el uso de etiquetas de afinidad (véase, por ejemplo, Shimp y col., *Protein Expr Purif.* 50:58-67, 2006). Como ejemplo adicional, algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear un sistema de producción de alto rendimiento de *E. coli* de choque con frío, dado que la sobreexpresión de proteínas en *Escherichia coli* a baja temperatura mejora su solubilidad y estabilidad (véase, por ejemplo, Qing y col., *Nature Biotechnology*. 22:877-882, 2004).

Se incluyen también sistemas de fermentación bacteriana de alta densidad. Por ejemplo, el cultivo de alta densidad de células de *Ralstonia eutropha* permite la producción de proteínas a densidades celulares de más de 150 g/L, y la expresión de proteínas recombinantes con valores superiores a 10 g/L. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*,

puede usarse una serie de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH. Para revisiones, véase Ausubel y col. (más arriba) y Grant y col., *Methods Enzymol.* 153:516-544 (1987). Se incluyen también sistemas de expresión de *Pichia pandoris* (véase, por ejemplo, Li y col., *Nature Biotechnology.* 24, 210 - 215, 2006; y Hamilton y col., *Science*, 301:1244, 2003). Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen sistemas de levaduras que se diseñan para glucosilar selectivamente proteínas, lo que incluye levaduras que tienen vías de N-glucosilación humanizadas, entre otros (véase, por ejemplo, Hamilton y col., *Science.* 313:1441-1443, 2006; Wildt y col., *Nature Reviews Microbiol.* 3:119-28, 2005; y Gerngross y col., *Nature-Biotechnology.* 22:1409-1414, 2004; patentes de EE.UU. nº 7.629.163; 7.326.681; y 7.029.872). Simplemente a modo de ejemplo, los cultivos de levaduras recombinantes pueden desarrollarse en matraces Fernbach o fermentadores de 15 L, 50 L, 100 L y 200 L, entre otros.

En los casos donde se usan vectores de expresión de plantas, la expresión de secuencias que codifican polipéptidos puede accionarse mediante cualquiera de una serie de promotores. Por ejemplo, pueden usarse promotores víricos tales como los promotores 35S y 19S de CaMV en solitario o en combinación con la secuencia delantera omega de TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 6:307-311 (1987)). Alternativamente, pueden usarse promotores de plantas tales como la pequeña subunidad de RUBISCO o promotores de choque por calor (Coruzzi y col., *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984); Broglie y col., *Science* 224:838-843 (1984); y Winter y col., *Results Probl. Cell Difer.* 17:85-105 (1991)). Estas construcciones pueden introducirse en las células vegetales mediante transformación de ADN directa o transfección mediada por patógenos. Dichas técnicas se describen en una serie de revisiones disponibles en general (véase, por ejemplo, Hobbs en McGraw Hill, *Yearbook of Science and Technology*, pág. 191-196 (1992)).

También puede usarse un sistema de insectos para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en dicho sistema, se usa el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en células de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el polipéptido pueden clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de polihedrina, y se colocan bajo el control del promotor de polihedrina. La inserción con éxito de la secuencia que codifica el polipéptido convertirá al gen de polihedrina en inactivo y producirá virus recombinante que carece de la proteína de recubrimiento. Los virus recombinantes pueden usarse a continuación para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o células de *Trichoplusia* en las que puede expresarse el polipéptido de interés (Engelhard y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3224-3227 (1994)). Se incluyen también sistemas de expresión de baculovirus, que incluyen los que usan células SF9, SF21 y *T. ni* (véase, por ejemplo, Murphy y Piwnica-Worms, *Curr Protoc Protein Sci.* Capítulo 5: unidad 5.4, 2001). Los sistemas de insectos pueden proporcionar modificaciones de post-traducción que son similares a los sistemas de mamíferos.

En células hospedadoras de mamíferos, se conoce bien en la técnica una serie de sistemas de expresión que están disponibles comercialmente. Los sistemas de vectores de mamíferos de ejemplo incluyen por ejemplo, pCEP4, pREP4 y pREP7 de Invitrogen, el sistema PerC6 de Crucell y sistemas basados en lentivirus tales como pLP1 de Invitrogen, y otros. Por ejemplo, en los casos donde se usa un adenovirus como vector de expresión, las secuencias que codifican un polipéptido de interés pueden ligarse en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y la secuencia delantera tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma vírico puede usarse para obtener un virus viable que sea capaz de expresar el polipéptido en células hospedadoras infectadas (Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:3655-3659, 1984). Además, pueden usarse potenciadores de transcripción, tales como el virus del sarcoma de Rous (RSV), para incrementar la expresión en células hospedadoras de mamíferos.

Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos útiles incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humana (293 o 293 células subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células renales de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de cáncer de cuello de útero humanas (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata de Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células DHFR-CHO (Urlaub y col., *PNAS USA* 77:4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como NSO y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares hospedadoras de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K.C Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pág. 255-268. Algunos sistemas de expresión de células de mamífero preferidos incluyen los sistemas de expresión basados en células CHO y HEK293. Los sistemas de expresión de mamífero pueden usar líneas celulares adjuntas, por ejemplo, en matraces T, botellas de

cultivo rotatorias, o fábricas de células, o cultivos en suspensión, por ejemplo, en matraces de agitación de 1 L y 5 L, biorreactores de tanques de agitación de 5 L, 14 L, 40 L, 100 L y 200 L, o biorreactores WAVE de 20/50 L y 100/200 L, entre otros conocidos en la técnica.

- 5 Se incluyen también procedimientos de expresión de proteínas sin células. Estas y otras realizaciones relacionadas de la presente descripción usan normalmente ARN polimerasa, ribosomas, tRNA y ribonucleótidos purificados. Dichos reactivos pueden producirse, por ejemplo, por extracción de células o de un sistema de expresión basado en células.
- 10 Además, una cepa de células hospedadoras puede elegirse por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada en la forma deseada. Dichas modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, modificaciones postraduccionales tales como acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación, o la inserción de aminoácidos de origen no natural (véanse en general las patentes de EE.UU. nº US-7.939.496; US-7.816.320; US-7.947.473; US-7.883.866; US-7.838.265; US-7.829.310; US-7.820.766; US-7.820.766; US-7.737.226, US-7.736.872; US-7.638.299; US-7.632.924; y US-7.230.068). Puede usarse también procesamiento postraduccional que escinde una forma "prepro" de la proteína para facilitar la correcta inserción, plegamiento y/o función. Para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña pueden elegirse diferentes células hospedadoras tales como levaduras, CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y W138, además de células bacterianas, que tienen o incluso carecen de maquinaria celular específica y
- 20 mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales.

- Los polipéptidos de HRS producidos por una célula recombinante pueden ser purificados y caracterizados de acuerdo con diversas técnicas conocidas en la técnica. Los sistemas de ejemplo para realizar purificación de proteínas y análisis de la pureza de las proteínas incluyen cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC) (por ejemplo, sistemas AKTA y Bio-Rad FPLC), cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (por ejemplo, HPLC de Beckman y Waters). Las técnicas químicas de ejemplo para la purificación incluyen cromatografía de intercambio de iones (por ejemplo, Q, S), cromatografía de exclusión de tamaños, gradientes de sales, purificación por afinidad purificación (por ejemplo, Ni, Co, FLAG, maltosa, glutatión, proteína A/G), cromatografía de intercambio de iones HYPERD® cerámica de fase inversa con filtrado de gel y columnas de interacción hidrófoba (HIC), entre otras
- 30 conocidas en la técnica. En las secciones de Ejemplos se describen también varios procedimientos de ejemplo.

Vectores recombinantes y polinucleótidos

- Otra realización de la presente descripción proporciona polinucleótidos recombinantes, vectores recombinantes y
- 35 vectores víricos recombinantes que comprenden un polinucleótido cuya secuencia comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los polipéptidos de HRS descritos en la presente memoria.

- Se incluyen también formulaciones que comprenden ARNm modificados y mejorados que codifican los polipéptidos de HRS que son capaces de reducir la actividad inmunitaria innata de una población de células en las que se introducen, incrementando así la eficiencia de la producción de proteínas en dicha población celular. Dichos ARNm modificados incluyen por ejemplo una estructura 5'Cap1 y una cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos de longitud, y que se formulan opcionalmente en una formulación de lípidos tal como un liposoma, lipoplexo o nanopartícula lipídica, tal como se describe por ejemplo en la publicación de solicitud de EE.UU. nº 2012/0.251.618, y las solicitudes internacionales nº PCT/US2011/046.861 y PCT/US2011/054.636.
- 40

- La selección de vectores recombinantes adecuados para expresar los polipéptidos de HRS de la presente descripción, los procedimientos para insertar secuencias de ácidos nucleicos para expresar los polipéptidos de HRS en el vector y los procedimientos de suministro del vector recombinante a las células de interés se sitúan dentro de las particularidades de la técnica. Véase, por ejemplo Tuschl, T. (2002), Nat. Biotechnol. 20: 446-448; Brummelkamp
- 50 T R y col. (2002), Science 296: 550-553; Miyagishi M y col. (2002), Nat. Biotechnol. 20: 497-500; Paddison P J y col. (2002), Genes Dev. 16: 948-958; Lee N S y col. (2002), Nat. Biotechnol. 20: 500-505; Paul C P y col. (2002), Nat. Biotechnol. 20: 505-508, Conese y col., Gene Therapy 11: 1735-1742 (2004), y Fjord-Larsen y col., (2005) Exp Neurol 195:49-60.

- 55 Los vectores de expresión recombinantes representativos disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, pREP4, pCEP4, pREP7 y pcDNA3.1 y pcDNA™5/FRT de Invitrogen, y pBK-CMV y pExchange-6 Core Vectors de Stratagene. Los vectores de expresión víricos representativos disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, los sistemas basados en adenovirus, tales como el sistema Por.C6 disponible en Crucell, Inc., sistemas basados en lentivirus tales como pLP1 de Invitrogen, y vectores retrovíricos tales como los vectores retrovíricos pFB-ERV y pCFB-EGSH de Stratagene (US).
- 60

En general, puede usarse cualquier vector recombinante o vírico capaz de aceptar las secuencias codificantes para la expresión de los polipéptidos de HRS, por ejemplo vectores derivados de adenovirus (AV); virus adenoasociados (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), rabdovirus, virus de la leucemia murina); virus del herpes, papilomavirus (patentes de EE.UU. nº 6.399.383 y 7.205.126) y similares. El tropismo de los vectores víricos puede modificarse también mediante seudotipado de los vectores con proteínas de envoltura u otros antígenos de superficie de otros virus. Por ejemplo, un vector AAV descrito en la presente memoria puede someterse a seudotipado con proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV), rabia, Ébola, Mokola y similares. También pueden usarse pseudoviriones no infecciosos, por ejemplo de papilomavirus, para facilitar el suministro eficiente de genes a las membranas mucosas (patente de EE.UU. nº 7.205.126, Peng y col., Gene Ther. 2010 Jul 29 epub).

En algunos aspectos de la presente descripción, en la presente descripción pueden usarse vectores víricos procedentes de AV y AAV. Los vectores de AAV adecuados para expresar los polipéptidos de HRS descritos en la presente memoria, los procedimientos para construir el vector de AAV recombinante y los procedimientos para suministrar los vectores en células diana se describen en Samulski R y col. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J y col. (1996), J. Virol., 70: 520-532; Samulski R y col. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; la patente de EE.UU. nº 5.252.479; la patente de EE.UU. nº 5.139.941; solicitud de patente internacional nº WO-94/13.788; y solicitud de patente internacional nº WO-93/24.641.

Normalmente los vectores recombinantes y los vectores víricos recombinantes incluyen secuencias de control de expresión que dirigen la expresión del polinucleótido de la presente descripción en diversos sistemas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, un conjunto de elementos reguladores dirigirá la expresión en ciertas células o tejidos de mamíferos y otro conjunto de elementos reguladores dirigirá la expresión a células bacterianas y un tercer conjunto de elementos reguladores dirigirá la expresión a sistemas de baculovirus. Algunos vectores son vectores híbridos que contienen elementos reguladores necesarios para la expresión en más de un sistema. Los vectores que contienen estos diversos sistemas reguladores están disponibles comercialmente y un experto en la materia podrá clonar los polinucleótidos descritos en la presente memoria en dichos vectores.

En algunos casos, los polinucleótidos o vectores poseerán promotores para la expresión de los polipéptidos de HRS en una amplia variedad de células. En otros casos, los vectores poseerán promotores que son específicos del tejido. Por ejemplo, los promotores dirigen la expresión sólo en células inmunitarias, células de músculo. En algunos aspectos de la presente descripción, el vector de la presente descripción comprende un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido de HRS de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182.

Los polinucleótidos y vectores recombinantes pueden administrarse a un paciente directamente o en conjunción con un reactivo de suministro adecuado, que incluye el reactivo lipófilo Minis Transit LT1; lipofectina; lipofectamina; celfectina; policationes (por ejemplo, polilisina) o liposomas. La selección de vectores víricos recombinantes adecuados para su uso en la presente descripción, los procedimientos para insertar secuencias de ácidos nucleicos para expresar los polipéptidos de HRS en el vector y los procedimientos de suministro del vector vírico a las células de interés se sitúan dentro de las particularidades de la técnica. Véase, por ejemplo, Dornburg R (1995), *Gene Therap.* 2: 301-310; Eglitis M A (1988), *Biotechniques* 6: 608-614; Miller A D (1990), *Hum Gene Therap.* 1: 5-14; y Anderson W F (1998), *Nature* 392: 25-30.

45 Células hospedadoras

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen una célula hospedadora transformada con un vector o polinucleótido descrito en la presente memoria. En algunos aspectos de la presente descripción, los polipéptidos de HRS descritos en la presente memoria son expresados por la célula hospedadora con el fin de producir o fabricar el polipéptido de HRS. Dichas células hospedadoras incluyen bacterias, células de insectos, células de levaduras y células de mamíferos.

En algunos aspectos de la presente descripción, las células hospedadoras pueden usarse para expresar y suministrar un polipéptido de HRS por medio de terapia celular. Por consiguiente, algunos aspectos de la presente descripción incluyen una terapia celular para tratar una enfermedad o trastorno autoinmunitario o inflamatorio, que comprende la administración de una célula hospedadora que expresa, o es capaz de expresar, un polipéptido de HRS de la presente descripción. En algunos aspectos de la presente descripción la enfermedad o trastorno se selecciona de entre miopatías inflamatorias, que incluyen, por ejemplo, polimiositis, dermatomiositis, solapamiento de polimiositis-esclerodermia, enfermedad pulmonar intersticial, neumonitis por hipersensibilidad, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, síndrome de Goodpasture, asma, distrofias musculares, caquexia y rabdomiólisis, entre otros descritos en la presente

memoria.

La terapia celular implica la administración de células que han sido seleccionadas, multiplicadas y tratadas o alteradas farmacológicamente (por ejemplo, modificadas genéticamente) fuera del cuerpo (Bordignon, C. y col., Cell Therapy: Achievements and Perspectives (1999), Haematologica, 84, pág. 1110-1149). Dichas células hospedadoras incluyen por ejemplo, células primarias, que incluyen células de músculo, PBMC, macrófagos y células madre que han sido modificadas genéticamente para expresar un polipéptido de HRS descrito en la presente memoria. El objetivo de la terapia celular es sustituir, reparar o potenciar la función biológica de los tejidos u órganos diana (Bordignon, C. y col., (1999), Haematologica, 84, pág. 1110-1149).

En algunos aspectos de la presente descripción de dichos procedimientos la célula hospedadora secreta el polipéptido de HRS y así proporciona una fuente sostenible del polipéptido de HRS en el tejido u órgano en el que se implanta la célula hospedadora.

15 **Otros agentes terapéuticos**

En algunas realizaciones de la presente descripción, las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria pueden emplear anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o proteínas de unión no de polipéptidos de HRS para bloquear la actividad de los anticuerpos anti-histidil-tRNA sintetasa. En algunos aspectos de la presente descripción, el anticuerpo o proteína de unión se dirige al dominio de unión a antígeno del autoanticuerpo, es decir, los anticuerpos representan anticuerpos anti-idiotipos, con lo que bloquean selectivamente la actividad del autoanticuerpo. Por consiguiente, dichos agentes de unión pueden usarse para diagnosticar, tratar o prevenir enfermedades, trastornos u otras afecciones que están mediadas por autoanticuerpos para una histidil-tRNA sintetasa asociada con una enfermedad autoinmunitaria.

El término "anticuerpo" describe una inmunoglobulina natural o producida parcial o totalmente de forma sintética. El término cubre también cualquier polipéptido o proteína que tiene un dominio de unión que es, o es homólogo a, un dominio de unión a antígeno. Los anticuerpos injertados en CDR, que incluyen anticuerpos biespecíficos, y los anticuerpos humanizados, en los que uno o más de las CDR proceden de anticuerpos obtenidos de linfocitos B identificados, clonados o seleccionados usando cualquiera de los procedimientos descritos o reivindicados en la presente memoria se contemplan también en este término.

Los "anticuerpos IgG naturales" y las "inmunoglobulinas IgG naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida, en algunos casos, a una cadena pesada por un enlace de disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces de disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes de disulfuro dentro de la cadena separados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable ("V_H") seguido por una serie de dominios constantes ("C_H"). Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo ("V_L") y un dominio constante ("C_L") en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos especiales forman una interconexión entre los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas.

El término "dominio variable" se refiere a dominios de proteínas que difieren extensivamente en secuencia entre los miembros de la familia (es decir, entre diferentes isoformas, o en diferentes especies). Con respecto a los anticuerpos, el término "dominio variable" se refiere a los dominios variables de anticuerpos que se usan en la unión y la especificidad de cada particular anticuerpo para su antígeno en particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables tanto los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes de dominios variables más conservadas se denominan "región marco" o "FR". Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras no modificadas comprenden cada uno cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente), que adoptan en sentido extenso una configuración en hoja β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de hoja β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígenos de los anticuerpos (véase Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), páginas 647-669). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero muestran varias funciones de efector, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

El término "región hipervariable" cuando se usa en la presente memoria se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígenos. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de tres "regiones de determinación de complementariedad" o "CDR", que se unen directamente, de forma complementaria, a un antígeno y son conocidas como CDR1, CDR2 y CDR3 respectivamente.

5

En el dominio variable de cadena ligera, las CDR corresponden a aproximadamente los residuos 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3), y en el dominio variable de la cadena pesada las CDR corresponden a aproximadamente los residuos 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3); Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J., *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

Tal como se usa en la presente memoria, "región marco variable" o "VFR" se refiere unos residuos de marco que forman una parte de la bolsa y/o surco de unión a antígenos que pueden entrar en contacto con el antígeno. En algunas realizaciones de la presente descripción, los residuos marco forman un bucle que es una parte de la bolsa o surco de unión a antígenos. Los residuos de aminoácidos en el bucle pueden estar o no en contacto con el antígeno. En una realización de la presente descripción, los aminoácidos del bucle de una VFR se determinan por inspección de la estructura tridimensional de un anticuerpo, cadena pesada de anticuerpo o cadena ligera de anticuerpo. La estructura tridimensional puede analizarse para posiciones de aminoácidos accesibles para el disolvente ya que es probable que dichas posiciones formen un bucle y/o proporcionen contacto con el antígeno en un dominio variable de anticuerpos. Algunas de las posiciones accesibles a disolventes pueden tolerar una diversidad de secuencias de aminoácidos y otras (por ejemplo, posiciones estructurales) pueden estar menos diversificadas. La estructura tridimensional del dominio variable de anticuerpos puede deducirse a partir de una modelización de proteínas o estructura cristalina. En algunas realizaciones de la presente descripción, la VFR comprende, consiste esencialmente en o consiste en posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 71 a 78 del dominio variable de la cadena pesada, con las posiciones definidas de acuerdo con Kabat y col., 1991. En algunas realizaciones de la presente descripción, la VFR forma una parte de la región marco 3 situada entre CDRH2 y CDRH3. Preferentemente, la VFR forma un bucle que está bien colocado para establecer contacto con un antígeno diana o forma parte de la bolsa de unión a antígeno.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada (Fc) que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa o (" κ ") y lambda o (" λ "), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Los términos "parte de unión a antígeno de un anticuerpo", "fragmento de unión a antígeno", "dominio de unión a antígeno", "fragmento de anticuerpo" o un "fragmento funcional de un anticuerpo" se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (véase, por ejemplo, Holliger y col., *Nature Biotech.* 23 (9): 1126-1129 (2005)). Los ejemplos no limitativos de fragmentos de anticuerpos incluidos, pero que no se limitan a, el término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región de determinación de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, mediante un conector sintético que permite que actúen como una única cadena de proteínas en la que los pares de regiones V_L y V_H forman moléculas monovalentes (conocidos como Fv de cadena única (scFv); véase por ejemplo, Bird y col. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston y col. (1988) *PNAS USA*. 85:5879-5883; y Osbourn y col. (1998) *Nat. Biotechnol.* 16:778). Dichos anticuerpos de cadena única pretenden también estar incluidos en el término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Cualquier secuencia V_H y V_L de scFv específicos puede estar unida a un ADNc de una región constante de inmunoglobulina humana o secuencias genómicas, con el fin de generar vectores de expresión que codifican moléculas IgG completas u otros isotipos. V_H y V_L pueden usarse también en la generación de Fab, Fv u otros fragmentos de inmunoglobulinas que usan química de proteínas o tecnología de ADN recombinante. Se incluyen

también otras formas de anticuerpos de cadena única, tales como diacuerpos.

Las fracciones "F(ab')₂" y "Fab'" pueden producirse mediante el tratamiento de una inmunoglobulina (anticuerpo monoclonal) con una proteasa tal como pepsina y papaína, e incluye un fragmento de anticuerpo generado por una
 5 inmunoglobulina de digestión cerca de los enlaces de disulfuro existentes entre las regiones bisagra en cada una de las dos cadenas H. Por ejemplo, la papaína escinde la IgG en sentido ascendente de los enlaces de disulfuro existentes entre las regiones bisagra en cada una de las dos cadenas H para generar dos fragmentos de anticuerpos homólogos en los que una cadena L compuesta por V_L (región variable de cadena L) y C_L (región constante de
 10 cadena L), y un fragmento de cadena H compuesto por V_H (región variable de cadena H) y C_{H1} (región γ1 en la región constante de cadena H) están conectados en sus regiones del extremo C a través de un enlace de disulfuro. Cada uno de estos dos fragmentos de anticuerpos homólogos se denomina Fab'. La pepsina escinde IgG en sentido descendente de los enlaces de disulfuro existentes entre las regiones bisagra en cada una de las dos cadenas H para generar un fragmento de anticuerpo ligeramente mayor que el fragmento en el que están conectados los dos Fab' mencionados anteriormente en la región bisagra. Este fragmento de anticuerpo se denomina F(ab')₂.

15 El fragmento Fab contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxilo del dominio de la cadena pesada C_{H1} que incluye una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpos. Fab'-SH es la designación en la presente memoria para Fab' en el que los residuos de cisteína de los
 20 dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos fueron producidos originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Se conocen también otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un reconocimiento de antígenos completo y un sitio de
 25 unión a antígenos. Esta región consiste en un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. En esta configuración interaccionan las tres regiones hipervariables de cada dominio variable para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. En conjunto las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno)
 30 tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque en una afinidad menor que el sitio de unión completo.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena única" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptidos. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido conector entre los dominios V_H y V_L que permite
 35 que el sFv forme la estructura deseada para unión a antígenos. Para una revisión de las moléculas sFv, véase, por ejemplo, Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg y Moore ed. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

Tal como se usa en la presente memoria, los anticuerpos o dominios variables de anticuerpos "naturales" o "de
 40 origen natural", se refieren a anticuerpos o dominios variables de anticuerpos que tienen una secuencia de un anticuerpo o dominio variable de anticuerpo identificado a partir de una fuente no sintética, por ejemplo, de una secuencia de línea germinal, o un linfocito B específico de antígeno diferenciado obtenido *ex vivo*, o su línea celular de hibridoma correspondiente, o del suero de un animal. Estos anticuerpos pueden incluir anticuerpos generados en cualquier tipo de respuesta inmunitaria, ya sea natural o inducida por otros medios. Los anticuerpos naturales
 45 incluyen las secuencias de aminoácidos, y las secuencias de nucleótidos que constituyen o codifican estos anticuerpos, por ejemplo, tal como se identifica en la base de datos Kabat.

Los anticuerpos pueden prepararse mediante cualquiera de una serie de técnicas conocidas para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
 50 Los anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido de interés pueden prepararse, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976, y mejoras de la misma. Se incluyen también procedimientos que usan animales transgénicos tales como ratones para expresar anticuerpos humanos. Véase, por ejemplo, Neuberger y col., *Nature Biotechnology* 14:826, 1996; Lonberg y col., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101, 1994; y Lonberg y col., *Internal Review of Immunology* 13:65-93, 1995. Los ejemplos
 55 particulares incluyen la plataforma VELOCIMMUNE® de REGNEREX® (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. nº 6.596.541). Los anticuerpos también pueden generarse o identificarse mediante el uso de bibliotecas de presentación de fagos o de presentación de levaduras (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. nº 7.244.592; Chao y col., *Nature Protocols*. 1:755-768, 2006). Los ejemplos no limitativos de bibliotecas disponibles incluyen bibliotecas clonadas o sintéticas, tales como la Human Combinatorial Antibody Library (HuCAL), en la que la diversidad
 60 estructural del repertorio de anticuerpo humanos está representada por genes de región variable de siete cadenas pesadas y siete cadenas ligeras. La combinación de estos genes da lugar a 49 marcos en la biblioteca principal.

Mediante la superposición de casetes genéticas altamente variables (CDR = regiones de determinación de complementariedad) en estos marcos puede reproducirse el inmenso repertorio de anticuerpos humanos. Se incluyen también bibliotecas humanas diseñadas con fragmentos de fuente de donante humano que codifican una región variable de cadena ligera, una CDR-3 de cadena pesada y un ADN sintético que codifica la diversidad en

5 CDR-1 de cadena pesada y un ADN sintético que codifica la diversidad en CDR-2 de cadena pesada. Existen otras bibliotecas adecuadas para su uso que serán evidentes para los expertos en la materia.

De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, la presente descripción proporciona además alternativas de anticuerpos u otros agentes de unión, tales como receptores solubles, adnectinas, péptidos, miméticos de péptidos, aptámeros, etc., que muestran especificidad de unión para un autoanticuerpo para una histidil-tRNA sintetasa, y las composiciones y procedimientos de uso de las mismas. Los agentes de unión pueden usarse en cualquiera de los procedimientos y composiciones terapéuticos descritos en la presente memoria. En particular son útiles agentes de unión de base biológica tales como adnectinas, receptores solubles, avímeros y trinectinas.

15 En algunas realizaciones de la presente descripción, dichos agentes de unión son eficaces para bloquear los autoanticuerpos para una histidil-tRNA sintetasa asociada con una enfermedad autoinmunitaria. Por consiguiente, dichos agentes de unión pueden usarse para diagnosticar, tratar o prevenir enfermedades, trastornos u otras afecciones condiciones que están mediadas por autoanticuerpos para una histidil-tRNA sintetasa asociada con una enfermedad autoinmunitaria, tal como la actividad antagonista o agonista de su actividad parcial o totalmente.

20 Tal como se indica anteriormente, los "péptidos" se incluyen como agentes de unión. El término péptido se refiere normalmente a un polímero de residuos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos del mismo. En algunas realizaciones de la presente descripción, el término "péptido" se refiere a polipéptidos relativamente cortos, que incluyen péptidos que consisten en aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 aminoácidos, que incluyen todos los números enteros e intervalos (por ejemplo, 5-10, 8-12, 10-15) intermedios, e interaccionan con uno o más autoanticuerpos para una histidil-tRNA sintetasa asociada con una enfermedad autoinmunitaria. Los péptidos pueden estar compuestos por aminoácidos de origen natural y/o aminoácidos de origen no natural, tal como se describe en la presente memoria.

30 Además de péptidos que consisten sólo en aminoácidos de origen natural, se proporcionan también peptidomiméticos o análogos de péptidos. Los análogos de péptidos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido de plantilla. Estos tipos de compuesto no peptídicos se denominan "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos" (Luthman, y col., *A Textbook of Drug Design and Development*, 14:386-406, 2ª ed., Harwood Academic Publishers (1996); Joachim Grante, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:1699-1720 (1994); Fauchere, J. *Adv. Drug Res.*, 15:29 (1986); Veber y Freidinger *TINS*, pág. 392 (1985); y Evans, y col., *J. Med. Chem.* 30:229 (1987)). Un peptidomimético es una molécula que emula la actividad biológica de un péptido pero no es ya peptídica por su naturaleza química. Los compuestos peptidomiméticos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.245.886.

40 La presente descripción incluye también peptoides. Los derivados peptoides de péptidos representan otra forma de péptidos modificados que conservan los importantes determinantes estructurales para la actividad biológica, y además eliminan los enlaces peptídicos, confiriendo así resistencia a la proteólisis (Simon, y col., *PNAS USA*. 89:9367-9371, 1992). Los peptoides son oligómeros de glicinas sustituidas en N. Se ha descrito una serie de grupos de N-alquilo, cada uno correspondiente a la cadena lateral de un aminoácido natural. Los peptidomiméticos de la presente descripción incluyen compuestos en los que al menos un residuo de aminoácido, algunos residuos de aminoácidos o todos los residuos de aminoácidos están sustituidos por las glicinas correspondientes sustituidas en N. Se describen bibliotecas de peptoides, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.811.387.

Los aptámeros también se incluyen como agentes de unión (véase, por ejemplo, Ellington y col., *Nature* 346, 818-22, 1990; y Tuerk y col., *Science* 249, 505-10, 1990). Los ejemplos de aptámeros incluyen aptámeros de ácidos nucleicos (por ejemplo, aptámeros de ADN, aptámeros de ARN) y aptámeros de péptidos. Los aptámeros de ácidos nucleicos se refieren en general a especies de ácidos nucleicos que han sido diseñadas a través de tandas repetidas de selección *in vitro* o un procedimiento equivalente, tal como SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial), para unirse a varias dianas moleculares tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos e incluso células, tejidos y organismos. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.376.190; y 6.387.620. En ellas se incluyen aptámeros de ácidos nucleicos que se unen a polipéptidos AARS descritos en la presente memoria y/o a sus contrapartes de unión celular.

Los aptámeros de péptidos incluyen normalmente un bucle de péptido variable unido en los dos extremos a una proteína de soporte, una doble restricción estructural que incrementa normalmente la afinidad de unión del aptámero de péptido a niveles comparables a los de un anticuerpo (por ejemplo, en el intervalo del nanomol). En algunas

realizaciones de la presente descripción, la longitud del bucle variable puede estar compuesta por aproximadamente 10-20 aminoácidos (lo que incluye todos los números enteros intermedios), y el soporte puede incluir cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad y compacidad. Algunas realizaciones de ejemplo de la presente descripción pueden usar la proteína bacteriana tioredoxina-A como proteína de soporte, estando el bucle variable insertado en el sitio activo reductor (bucle -Cys-Gly-Pro-Cys- en la proteína no mutada), con las dos cadenas laterales de cisteínas capaces de un puente de disulfuro. Procedimientos para identificar péptido aptámeros se describen, por ejemplo, en la solicitud de EE.UU. nº 2003/0108532. En este sentido se incluyen aptámeros de péptidos que se unen a los polipéptidos AARS descritos en la presente memoria y/o a sus contrapartes de unión celular. La selección de aptámeros de péptidos puede realizarse usando diferentes sistemas conocidos en la técnica, que incluyen los sistemas de levaduras de dos híbridos.

Se incluyen también ADNECTINAS™, AVÍMEROS™, anáfonas y anticalinas que se unen específicamente a un fragmento de proteína AARS de la presente descripción. ADNECTINAS™ se refieren a una clase de productos biológicos diana de la fibronectina humana, una proteína extracelular abundante que se une naturalmente a otras proteínas. Véanse, por ejemplo, las solicitudes de EE.UU. nº 2007/0.082.365; 2008/0.139.791; y 2008/0.220.049. Las ADNECTINAS™ consisten normalmente en una estructura de fibronectina natural, así como los múltiples dominios de direccionamiento de una parte específica de la fibronectina humana. Los dominios de direccionamiento pueden diseñarse para facilitar una ADNECTINA™ que reconozca específicamente autoanticuerpos para una histidil-tRNA sintetasa asociada con una enfermedad autoinmunitaria.

Los AVÍMEROS™ se refieren a proteínas de unión multiméricas o péptidos diseñados usando transposición de exones *in vitro* y presentación de fagos. Múltiples dominios de unión están relacionados, lo que produce mayor afinidad y especificidad en comparación con dominios de inmunoglobulina de epítipo único. Véase, por ejemplo, Silverman y col., *Nature Biotechnology*. 23:1556-1561, 2005; la patente de EE.UU. nº 7.166.697; y las solicitudes de EE.UU. nº 2004/0.175.756, 2005/0.048.512, 2005/0.053.973, 2005/0.089.932 y 2005/0.221.384.

Se incluyen también proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin), que incluyen una clase de proteínas no de inmunoglobulina que pueden ofrecer ventajas con respecto a los anticuerpos para la unión diana en el descubrimiento de fármacos y el desarrollo de fármacos. Entre otros usos, las DARPins están adaptadas idealmente para la obtención de imágenes *in vivo* o el suministro de toxinas u otras cargas terapéuticas debido a sus favorables propiedades moleculares, que incluye tamaño pequeño y alta estabilidad. La producción de bajo coste en bacterias y la rápida generación de muchas DARPins específicas de la diana hacen que el enfoque de las DARPins sea útil para el descubrimiento de fármacos. Además, las DARPins pueden generarse fácilmente en formatos multiespecíficos, ofreciendo la posibilidad de dirigir una DARPin efectora a un órgano específico o dirigir múltiples receptores con una molécula compuesta por varias DARPins. Véase, por ejemplo, Stumpp y col., *Curr Opin Drug Discov Devel*. 10:153-159, 2007; solicitud de EE.UU. nº 2009/0.082.274; y documento PCT/EP2001/10454.

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen "monocuerpos", que normalmente usan el 10^a dominio de fibronectina tipo III de fibronectina humana (FNfn10) como soporte para la presentación de múltiples bucles superficiales para la unión diana. FNfn10 es una proteína pequeña (94 residuos) con una estructura intercalada β similar al plegamiento de inmunoglobulinas. Es muy estable sin enlaces de disulfuro o iones metálicos, y puede expresarse en la forma plegada correctamente con un alto nivel de bacterias. El soporte FNfn10 es compatible prácticamente con cualquier tecnología de presentación. Véase, por ejemplo, Batori y col., *Protein Eng*. 15:1015-20, 2002; y Wojcik y col., *Nat Struct Mol Biol*., 2010; y la patente de EE.UU. nº 6.673.901.

Las anticalinas se refieren a una clase de miméticos de anticuerpos, que normalmente se sintetizan de lipocalinas humanas, una familia de proteínas de unión con una región de bucle hipervariable soportada por un marco estructuralmente rígido. Véase, por ejemplo, la solicitud de EE.UU. nº 2006/0.058.510. Las anticalinas tienen normalmente un tamaño de aproximadamente 20 kDa. Las anticalinas pueden caracterizarse por una estructura de tipo barril formada por ocho hebras de β antiparalela (un soporte en barril de tipo β estable) que están conectadas por pares por cuatro bucles de péptidos y una hélice α anexa. En algunos aspectos de la presente descripción, se realizan desviaciones conformacionales para conseguir unión específica en la o las regiones de bucles hipervariables. Véase, por ejemplo, Skerra, *FEBS J*. 275:2677-83, 2008.

55 **Composiciones terapéuticas, formulaciones farmacéuticas, administración y kits**

Las realizaciones de la presente descripción incluyen composiciones terapéuticas o farmacéuticas para tratar enfermedad(es) inflamatoria(s), distrofias musculares, rabdomiólisis, caquexia y otras enfermedades descritas en la presente memoria, que comprenden al menos un polipéptido de HRS, donde el polipéptido de HRS posee una o más actividades no canónicas.

Se incluyen también composiciones terapéuticas o farmacéuticas para tratar enfermedad o enfermedades autoinmunitarias, que comprenden al menos un polipéptido de HRS, donde el polipéptido de HRS posee una o más actividades no canónicas.

- 5 Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a composiciones terapéuticas o farmacéuticas para tratar enfermedades autoinmunitarias, enfermedad(es) inflamatoria(s), distrofias musculares, rabdomiólisis, caquexia y otras enfermedades descritas en la presente memoria, que comprenden al menos un polipéptido de HRS, donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo que experimenta una reacción cruzada específicamente con un autoanticuerpo o linfocito T autorreactivo de una enfermedad asociada con autoanticuerpos para histidil-tRNA sintetasa, y/o posee una o más actividades no canónicas. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo Th de la histidil-tRNA sintetasa.

- 15 Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen composiciones terapéuticas o farmacéuticas para tratar enfermedades autoinmunitarias, enfermedad(es) inflamatoria(s), distrofias musculares, rabdomiólisis, caquexia y otras enfermedades descritas en la presente memoria, que comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de HRS de mamífero, donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo de la histidil-tRNA sintetasa y/o posee una o más actividades no canónicas, y donde el ácido nucleico está acoplado operativamente con secuencias de control de expresión para facilitar la expresión de la HRS en una célula.

- 20 Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen composiciones terapéuticas o farmacéuticas para tratar enfermedades asociadas con autoanticuerpos específicas para histidil-tRNA sintetasa, que comprenden una célula hospedadora recombinante, donde la célula hospedadora expresa al menos un polipéptido de HRS heterólogo que comprende al menos un epítipo de la histidil-tRNA sintetasa, y donde el ácido nucleico está acoplado operativamente con secuencias de control de expresión para facilitar la expresión de la HRS en una célula. Se incluyen también composiciones terapéuticas o farmacéuticas para tratar enfermedades asociadas con una insuficiencia de histidil-tRNA sintetasa, que comprenden al menos un polipéptido de HRS, donde el polipéptido de HRS es capaz de sustituir al menos una función canónica o no canónica de la histidil-tRNA sintetasa.

- 30 Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen composiciones terapéuticas o farmacéuticas para tratar enfermedades asociadas con un autoanticuerpo específico para histidil-tRNA sintetasa, que comprenden al menos un polipéptido de HRS, donde el polipéptido de HRS no compite significativamente por autoanticuerpos asociados a la enfermedad que se unen a histidil-tRNA sintetasa en un ensayo ELISA competitivo hasta una concentración de aproximadamente 1×10^{-7} M.

- 35 Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen composiciones terapéuticas o farmacéuticas que mejoran, optimizan o prolongan la estabilidad, homogeneidad, monodispersión o actividad de los polipéptidos de HRS.

- 40 También se incluyen en la presente invención composiciones terapéuticas o farmacéuticas médicamente útiles que comprenden un polipéptido de al menos aproximadamente 400 aminoácidos de un polipéptido de HRS; donde el polipéptido:

- a) es de al menos aproximadamente el 95% de pureza;
- b) tiene menos de aproximadamente el 5% de agregación; y
- 45 c) está libre sustancialmente de endotoxinas.

- En otra realización de la presente descripción las composiciones terapéuticas o farmacéuticas médicamente útiles comprenden un polipéptido de HRS de entre aproximadamente 40 y 80 aminoácidos; donde el polipéptido:

- 50 a) es de al menos aproximadamente el 95% de pureza;
- b) tiene menos de aproximadamente el 5% de agregación; y
- 55 c) está libre sustancialmente de endotoxinas.

Se incluyen también nuevos usos médicos de los polipéptidos de HRS en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

- 60 En cualquiera de estas composiciones y usos terapéuticos, las composiciones pueden formularse en soluciones farmacéuticamente aceptables, fisiológicamente aceptables y/o de calidad farmacéutica para la administración a una

célula, un sujeto o un animal, en solitario o en combinación con una o más de otras modalidades de terapia. Se entenderá también que, si se desea, las composiciones de la presente descripción pueden administrarse también en combinación con otros agentes, como, por ejemplo, otras proteínas o polipéptidos o agentes farmacéuticamente activos. En este contexto "administrado en combinación" incluye (1) parte de la misma forma de dosificación unitaria; y (2) la administración por separado, pero como parte del mismo programa o régimen de tratamiento terapéutico, normalmente, pero no necesariamente, en el mismo día.

En algunas realizaciones de la presente descripción, las composiciones comprenden una mezcla de 2 o más polipéptidos de HRS. En algunos aspectos de la presente descripción las composiciones pueden comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 50, o aproximadamente 2 a aproximadamente 25, o aproximadamente 2 a aproximadamente 15, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más polipéptidos de HRS descritos en la presente memoria.

Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden una dosis terapéutica de un polipéptido de HRS incluyen uno cualquiera o más homólogos, ortólogos, variantes, fragmentos, polipéptidos modificados y/o isoformas de origen natural de histidil-tRNA sintetasa descritos en la presente memoria (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182, o cualquiera de los polipéptidos de HRS o ácidos nucleicos recogidos en las **Tablas D1-D9** o deducibles a partir de ellas).

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS no compite significativamente por autoanticuerpos asociados a la enfermedad que se unen a histidil-tRNA sintetasa de tipo no mutado en un ensayo ELISA competitivo hasta una concentración de aproximadamente 1×10^{-7} M. Por consiguiente en algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una menor afinidad al autoanticuerpo asociado a la enfermedad que la histidil-tRNA sintetasa de tipo no mutado (SEQ ID NO: 1) tal como se mide en un ensayo ELISA competitivo. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una afinidad aparente por el autoanticuerpo asociado a la enfermedad que es al menos aproximadamente 10 veces menor, o al menos aproximadamente 20 veces menor, o al menos aproximadamente 50 veces menor, o al menos aproximadamente 100 veces menor que la afinidad del autoanticuerpo asociado a la enfermedad para la forma humana de tipo no mutado (SEQ ID NO: 1).

Para producción farmacéutica, las composiciones de polipéptidos de HRS estarán normalmente sustancialmente libres de endotoxinas. Las endotoxinas son toxinas asociadas con ciertas bacterias, normalmente bacterias gramnegativas, aunque las endotoxinas pueden encontrarse en bacterias grampositivas, tales como *Listeria monocytogenes*. Las endotoxinas más prevalentes son lipopolisacáridos (LPS) o lipo-oligosacáridos (LOS) presentes en la membrana exterior de diversas bacterias gramnegativas, y que representan una característica patógena central en la capacidad de estas bacterias de causar enfermedades. Pequeñas cantidades de endotoxinas en los seres humanos pueden producir fiebre, un descenso de la presión arterial y una activación de la inflamación y la coagulación, entre otros efectos fisiológicos adversos.

Las endotoxinas pueden detectarse usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica. Por ejemplo, el ensayo de lisado del amebocito *Limulus*, que usa sangre del cangrejo herradura, es un ensayo muy sensible para detectar la presencia de endotoxina. En esta prueba, niveles muy bajos de LPS pueden provocar una coagulación detectable del lisado de *Limulus* debido a una potente cascada enzimática que amplifica esta reacción. Las endotoxinas también pueden cuantificarse mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Para estar sustancialmente libres de endotoxinas, los niveles de endotoxinas pueden ser de aproximadamente o inferiores a aproximadamente 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08, 0,09, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 UE/mg de proteína. Normalmente, 1 ng lipopolisacárido (LPS) corresponde a aproximadamente 1-10 UE.

En algunas realizaciones de la presente descripción, una composición tiene un contenido de endotoxinas de aproximadamente o inferior a aproximadamente 10 UE/mg de polipéptido de HRS, aproximadamente o inferior a aproximadamente 9 UE/mg de polipéptido de HRS, aproximadamente o inferior a aproximadamente 8 UE/mg de polipéptido de HRS, aproximadamente o inferior a aproximadamente 7 UE/mg de polipéptido de HRS, aproximadamente o inferior a aproximadamente 6 UE/mg de polipéptido de HRS, aproximadamente o inferior a aproximadamente 5 UE/mg de polipéptido de HRS, aproximadamente o inferior a aproximadamente 4 UE/mg de polipéptido de HRS, aproximadamente o inferior a aproximadamente 3 UE/mg de polipéptido de HRS, aproximadamente o inferior a aproximadamente 2 UE/mg de polipéptido de HRS, aproximadamente o inferior a aproximadamente 1 UE/mg de polipéptido de HRS, aproximadamente o inferior a aproximadamente 0,1 UE/mg de polipéptido de HRS, aproximadamente o inferior a aproximadamente 0,1 UE/mg de polipéptido de HRS, o aproximadamente o inferior a

aproximadamente 0,01 UE/mg de polipéptido de HRS. En algunas realizaciones de la presente descripción, tal como se indica anteriormente, una composición es al menos aproximadamente el 95%, 96%, 97%, o 98% libre de endotoxinas, al menos aproximadamente el 99% libre de endotoxinas, al menos aproximadamente el 99,5% libre de endotoxinas, o al menos aproximadamente el 99,99% libre de endotoxinas sobre una base de proteínas p/p.

5

En algunas realizaciones de la presente descripción, una composición comprende uno o más agentes de tampón de pH, es decir, tampones. Los tampones de ejemplo incluyen histidina (por ejemplo, L-histidina, D-histidina), tampones de citrato (por ejemplo, citrato de sodio, ácido cítrico, mezclas de los mismos) y tampones de fosfato (por ejemplo, fosfato de sodio, solución salina con tampón de fosfato (PBS)).

10

En algunas realizaciones de la presente descripción, el tampón está presente en una concentración comprendida desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 95 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 90 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 85 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 80 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 75 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 65 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 60 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 55 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 45 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 35 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 25 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 20 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 15 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 10 mM, o aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 5 mM.

15

20

En algunas realizaciones de la presente descripción, el tampón está presente en una concentración comprendida desde aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 95 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 90 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 85 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 80 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 75 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 65 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 60 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 55 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 45 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 35 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 25 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 15 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM.

30

35

En algunas realizaciones de la presente descripción, el tampón está presente en una concentración comprendida desde aproximadamente 2 mM a aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 95 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 90 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 85 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 80 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 75 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 65 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 60 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 55 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 45 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 35 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 25 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 20 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 15 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 10 mM, o aproximadamente 2 mM a aproximadamente 5 mM.

40

45

En algunas realizaciones de la presente descripción, el tampón está presente en una concentración comprendida desde aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 95 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 90 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 85 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 80 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 75 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 65 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 60 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 55 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 45 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM.

50

55

En algunas realizaciones de la presente descripción, el tampón está presente en una concentración comprendida desde aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 10 mM a aproximadamente 95

60

En algunas realizaciones de la presente descripción, el tampón está presente en una concentración comprendida desde aproximadamente 40-60, 41-60, 42-60, 43-60, 44-60, 45-60, 46-60, 47-60, 48-60, 49-60, 50-60, 51-60, 52-60, 53-60, 54-60, 55-60, 56-60, 57-60, 58-60, 59-60 mM, o aproximadamente 40-59, 41-59, 42-59, 43-59, 44-59, 45-59, 46-59, 47-59, 48-59, 49-59, 50-59, 51-59, 52-59, 53-59, 54-59, 55-59, 56-59, 57-59, 58-59 mM, o aproximadamente 40-58, 41-58, 42-58, 43-58, 44-58, 45-58, 46-58, 47-58, 48-58, 49-58, 50-58, 51-58, 52-58, 53-58, 54-58, 55-58, 56-58, 57-58 mM, o aproximadamente 40-57, 41-57, 42-57, 43-57, 44-57, 45-57, 46-57, 47-57, 48-57, 49-57, 50-57, 51-57, 52-57, 53-57, 54-57, 55-57, 56-57 mM, o aproximadamente 40-56, 41-56, 42-56, 43-56, 44-56, 45-56, 46-56, 47-56, 48-56, 49-56, 50-56, 51-56, 52-56, 53-56, 54-56, 55-56 mM, o aproximadamente 40-55, 41-55, 42-55, 43-55, 44-55, 45-55, 46-55, 47-55, 48-55, 49-55, 50-55, 51-55, 52-55, 53-55, 54-55 mM, o aproximadamente 40-54, 41-54, 42-54, 43-54, 44-54, 45-54, 46-54, 47-54, 48-54, 49-54, 50-54, 51-54, 52-54, 53-54 mM, o aproximadamente 40-53, 41-53, 42-53, 43-53, 44-53, 45-53, 46-53, 47-53, 48-53, 49-53, 50-53, 51-53, 52-53 mM, o aproximadamente 40-52, 41-52, 42-52, 43-52, 44-52, 45-52, 46-52, 47-52, 48-52, 49-52, 50-52, 51-52 mM, o aproximadamente 40-51, 41-51, 42-51, 43-51, 44-51, 45-51, 46-51, 47-51, 48-51, 49-51, 50-51 mM, o aproximadamente 40-50, 41-50, 42-50, 43-50, 44-50, 45-50, 46-50, 47-50, 48-50, 49-50 mM, o aproximadamente 40-49, 41-49, 42-49, 43-49, 44-49, 45-49, 46-49, 47-49, 48-49 mM, o aproximadamente 40-48, 41-48, 42-48, 43-48, 44-48, 45-48, 46-48, 47-48 mM, o aproximadamente 40-47, 41-47, 42-47, 43-47, 44-47, 45-47, 46-47 mM, o aproximadamente 40-46, 41-46, 42-46, 43-46, 44-46, 45-46 mM, o aproximadamente 40-45, 41-45, 42-45, 43-45, 44-45 mM, o aproximadamente 40-44, 41-44, 42-44, 43-44 mM, o aproximadamente 40-43, 41-43, 42-43 mM, o aproximadamente 40-42, 41-42 mM, o aproximadamente 40-42 mM.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende un tampón a una concentración de aproximadamente 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100 mM, lo que incluye todos los intervalos intermedios.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la presencia del tampón altera (por ejemplo, mejora, aumenta, disminuye, reduce) una o más propiedades bioquímicas, físicas y/o farmacocinéticas del polipéptido de HRS con respecto a una composición sin el tampón o con un tampón diferente.

Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del tampón tiene el aumento de actividad biológica que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el tampón o con un tampón diferente. Las actividades de ejemplo incluyen cualquiera de las actividades no canónicas descritas en la presente memoria, tales como actividades antiinflamatorias y otras actividades biológicas, lo que incluye unión de anticuerpos (por ejemplo, unión a anticuerpos anti-Jo-1). En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en el tampón tiene una actividad biológica al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces mayor o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% mayor que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el tampón o con un tampón diferente. En aspectos específicos de la presente descripción, el tampón es un tampón de histidina.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del tampón tiene mayor "estabilidad" (por ejemplo, tal como se mide por vida media), que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces mayor o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% mayor que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el tampón o con un tampón diferente. En aspectos específicos de la presente descripción, el tampón es un tampón de histidina.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la "estabilidad" del polipéptido de HRS incluye su "estabilidad funcional", o la velocidad a la que al menos una actividad biológica del polipéptido de HRS se reduce en un conjunto dado de condiciones con el tiempo. Las actividades biológicas de ejemplo incluyen una cualquiera o más de entre las actividades canónicas o no canónicas descritas en la presente memoria, lo que incluye, por ejemplo, la retención de al menos un epítipo que experimenta una reacción cruzada específicamente con un anticuerpo anti-Jo-1. En algunas realizaciones de la presente descripción, la actividad biológica del polipéptido de HRS en presencia del tampón se reduce en una velocidad que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces más lenta o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% más

lenta que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el tampón o con un tampón diferente. En aspectos específicos de la presente descripción, el tampón es un tampón de histidina.

- 5 En algunas realizaciones de la presente descripción, la "estabilidad" del polipéptido de HRS incluye su "estabilidad cinética" o "estabilidad térmica", que incluye su velocidad de desplegado, agregación, o precipitación en un conjunto dado de condiciones con el tiempo. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del tampón se despliega, se agrega o precipita a una velocidad que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200
10 veces más lenta o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% más lenta que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el tampón o con un tampón diferente.

- En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del tampón se despliega,
15 se agrega o precipita a una velocidad que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces más lenta o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% más lenta que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante
20 aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el tampón o con un tampón diferente.

- En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del tampón tiene una
25 temperatura de fusión (T_f) que es al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% mayor que la temperatura de fusión de un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el tampón o con un tampón diferente. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del tampón tiene una temperatura de fusión (T_f) que es al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29,
30 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50°C mayor que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el tampón o con un tampón diferente. En aspectos específicos de la presente descripción, el tampón es un tampón de histidina.

- En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una homogeneidad o
35 monodispersión mejorada o aumentada (por ejemplo, proporción de monómeros/oligómeros, proporción de dímeros/oligómeros, proporción de monómeros/dímeros, proporción de dímeros/monómeros, proporción de formación de enlaces de disulfuro entre cadenas en condiciones reducidas, distribución de pesos moleculares aparentes, que incluye picos reducidos de peso molecular alto y/o peso molecular bajo detectado por análisis SDS-PAGE o HPLC) en presencia del tampón que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo
40 demás idéntica o comparable sin el tampón o con un tampón diferente. En algunas realizaciones de la presente descripción, la homogeneidad o monodispersión del polipéptido de HRS en el tampón está aumentada en al menos aproximadamente al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% que un polipéptido de HRS correspondiente en una
45 composición por lo demás idéntica o comparable sin el tampón o con un tampón diferente. En aspectos específicos de la presente descripción, el tampón es un tampón de histidina a un pH en el intervalo de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 7,5, o un tampón de citrato a un pH en el intervalo de aproximadamente pH 7,5 a aproximadamente pH 6,5.

- 50 En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición de polipéptido de HRS en presencia de la histidina o el tampón de citrato tiene picos reducidos de peso molecular alto por análisis SE-HPLC que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces menor o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% menor que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por
55 ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el tampón o con un tampón diferente. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS tiene un contenido máximo de peso molecular alto por análisis SE-HPLC que es inferior a aproximadamente el 2% del pico principal después de 2 días de almacenamiento a 37°C.
60 En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS tiene un contenido máximo de peso molecular alto que es inferior a aproximadamente el 1% del pico principal después de 2 días de almacenamiento a

37°C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición de polipéptido de HRS en presencia de la histidina o el tampón de citrato tiene pico o picos reducidos de peso molecular bajo por análisis SE-HPLC que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces menor o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% menor que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el tampón o con un tampón diferente.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición de polipéptido de HRS en presencia de la histidina o el tampón de citrato tiene una turbiedad reducida (A340) que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces menor o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% menor que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el tampón o con un tampón diferente. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS comprende un tampón de histidina de aproximadamente pH 7,0 a 7,5 y tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,5 después de 2 días de almacenamiento a 37°C. En aspectos específicos de la presente descripción, la composición de HRS tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,05 después de 2 días de almacenamiento a 37°C. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS comprende un tampón de citrato de aproximadamente pH 7,0 a 7,5 y tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,5 después de 2 días de almacenamiento a 37°C. En aspectos específicos de la presente descripción, la composición de HRS tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,05 después de 2 días de almacenamiento a 37°C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el pH de la composición (por ejemplo, en presencia del agente de tampón o tampón) es aproximadamente 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, o aproximadamente 8,0. En algunas realizaciones de la presente descripción, el pH de la composición está en el intervalo de aproximadamente 6,0-6,1, 6,0-6,2, 6,0-6,3, 6,0-6,4, 6,0-6,5, 6,0-6,6, 6,0-6,7, 6,0-6,8, 6,0-6,9, 6,0-7,0, 6,0-7,1, 6,0-7,2, 6,0-7,3, 6,0-7,4, 6,0-7,5, 6,0-7,6, 6,0-7,7, 6,0-7,8, 6,0-7,9, 6,0-8,0, o de aproximadamente 6,5-6,6, 6,5-6,7, 6,5-6,8, 6,5-6,9, 6,5-7,0, 6,5-7,1, 6,5-7,2, 6,5-7,3, 6,5-7,4, 6,5-7,5, 6,5-7,6, 6,5-7,7, 6,5-7,8, 6,5-7,9, 6,5-8,0, o de aproximadamente 7,0-7,1, 7,0-7,2, 7,0-7,3, 7,0-7,4, 7,0-7,5, 7,0-7,6, 7,0-7,7, 7,0-7,8, 7,0-7,9, 7,0-8,0, o de aproximadamente 7,2-7,3, 7,2-7,4, 7,2-7,5, 7,2-7,6, 7,2-7,7, 7,2-7,8, 7,2-7,9, 7,2-8,0, o de aproximadamente 7,4-7,5, 7,4-7,6, 7,4-7,7, 7,4-7,8, 7,4-7,9, 7,4-8,0, o de aproximadamente 7,5-7,6, 7,5-7,7, 7,5-7,8, 7,5-7,9, 7,5-8,0, o de aproximadamente 7,6-7,7, 7,6-7,8, 7,6-7,9, o 7,6-8,0.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el pH de la composición o tampón altera (por ejemplo, mejora, aumenta, disminuye, reduce) una o más propiedades bioquímicas, físicas y/o farmacocinéticas del polipéptido de HRS con respecto a una composición que tienen un pH fuera de los intervalos anteriores. En realizaciones específicas de la presente descripción, el tampón es histidina y el pH de la composición está en el intervalo de aproximadamente 7,0-7,5. En otras realizaciones de la presente descripción, el tampón es un tampón de citrato y el pH de la composición está en el intervalo de aproximadamente 6,5-7,5. En otras realizaciones de la presente descripción, el tampón es un tampón de fosfato de sodio y el pH de la composición está en el intervalo de aproximadamente 7,0-7,5.

Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en una composición que comprende (a) un tampón de histidina y un pH de aproximadamente 7,0-7,5, (b) un tampón de citrato y un pH de aproximadamente 6,5-7,5, o (c) un tampón de fosfato y un pH de aproximadamente 7,0-7,5 tiene el aumento de actividad biológica con respecto a una composición comparable que tiene un pH fuera de dichos intervalos en (a), (b), o (c) anterior. Las actividades de ejemplo incluyen cualquiera de las actividades no canónicas descritas en la presente memoria, tales como actividades antiinflamatorias y otras actividades biológicas, lo que incluye unión de anticuerpos (por ejemplo, unión a anticuerpos anti-Jo-1). En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces mayor o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% mayor actividad biológica que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable que tiene un pH fuera de dichos intervalos en (a), (b), o (c) anterior.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en una composición que comprende (a) un tampón de histidina y un pH de aproximadamente 7,0-7,5, (b) un tampón de citrato y un pH de aproximadamente 6,5-7,5, o (c) un tampón de fosfato y un pH de aproximadamente 7,0-7,5 tiene mayor "estabilidad" (por ejemplo, tal como se mide por vida media), que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces mayor o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% mayor que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable que tiene un pH fuera de dichos intervalos en (a), (b), o (c) anterior.

- 10 En algunas realizaciones de la presente descripción, la "estabilidad" del polipéptido de HRS incluye su "estabilidad funcional", o la velocidad a la que al menos una actividad biológica del polipéptido de HRS se reduce en un conjunto dado de condiciones con el tiempo. Las actividades biológicas de ejemplo incluyen una cualquiera o más de entre las actividades canónicas o no canónicas descritas en la presente memoria, lo que incluye, por ejemplo, la retención de al menos un epítipo que experimenta una reacción cruzada específicamente con un anticuerpo anti-Jo-1.
- 15 algunas realizaciones de la presente descripción, la actividad biológica del polipéptido de HRS se reduce en una velocidad que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces más lenta o al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% más lenta que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable que tiene un pH fuera de dichos intervalos en (a), (b), o (c) anterior.
- 20

- En algunas realizaciones de la presente descripción, la "estabilidad" del polipéptido de HRS incluye su "estabilidad cinética" o "estabilidad térmica", que incluye su velocidad de desplegado en un conjunto dado de condiciones con el tiempo. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS se despliega a una velocidad que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces más lenta o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% más lenta que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable que tiene un pH fuera de dichos intervalos. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una temperatura de fusión (T_f) que es al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% mayor que la temperatura de fusión de un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable que tiene un pH fuera de dichos intervalos en (a), (b), o (c) anterior. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una temperatura de fusión (T_f) que es al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50°C mayor que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable que tiene un pH fuera de dichos intervalos en (a), (b), o (c) anterior.
- 25
- 30
- 35

- En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene homogeneidad o monodispersión mejoradas o aumentadas (por ejemplo, proporción de monómeros/oligómeros, proporción de dímeros/oligómeros, proporción de monómeros/dímeros, proporción de dímeros/monómeros, proporción de formación de enlaces de disulfuro entre cadenas en condiciones reducidas, distribución de pesos moleculares aparentes por ejemplo picos reducidos de peso molecular alto o peso molecular bajo detectados por análisis SDS-PAGE o HPLC) que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable que tiene un pH fuera de dichos intervalos en (a), (b), o (c) anterior. En algunas realizaciones de la presente descripción, la homogeneidad o monodispersión del polipéptido de HRS es incrementa en al menos aproximadamente al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable que tiene un pH fuera de dichos intervalos en (a), (b), o (c) anterior.
- 40
- 45

- 50 En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición de polipéptido de HRS dentro de los intervalos de pH en (a), (b), o (c) anterior tiene pico o picos reducidos de peso molecular alto por análisis SE-HPLC que son al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces menores o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% menores que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable que tiene un pH fuera de dichos intervalos en (a), (b), o (c) anterior.
- 55

- 60 En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición de polipéptido de HRS en los intervalos de pH

- (a), (b), o (c) anteriores tiene pico o picos reducidos de peso molecular bajo por análisis SE-HPLC que son al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces menores o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% menores que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable que tiene un pH fuera de dichos intervalos en (a), (b), o (c) anterior.
- 10 En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición de polipéptido de HRS en los intervalos de pH (a), (b), o (c) anterior tiene una turbiedad reducida (A340) que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces menor o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% menor que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente
- 15 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición comparable que tiene un pH fuera de dichos intervalos en (a), (b), o (c) anterior.
- 20 En algunas realizaciones de la presente descripción, una composición tiene una fuerza iónica definida, por ejemplo, una concentración definida de cloruro de sodio (NaCl) u otra sal. Por ejemplo, una composición puede tener aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390 ó 400 mM de NaCl u otra sal, que incluye todos los números enteros e intervalos intermedios. En algunas realizaciones de la presente descripción, una composición
- 25 tiene aproximadamente 50-300, 100-300, 150-300, 200-300, 250-300, 50-250, 100-250, 150-250, 200-250, 50-200, 100-200, 150-200, 50-150, 100-150, o 50-100 mM de NaCl u otra sal. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición tiene una alta concentración de sales, por ejemplo, aproximadamente o $\geq$ aproximadamente 140 mM de NaCl, aproximadamente o $\geq$ aproximadamente 280 mM de NaCl.
- 30 En algunas realizaciones de la presente descripción, la presencia de NaCl en uno cualquiera o más de entre estas concentraciones o intervalos altera (por ejemplo, mejora, aumenta, disminuye, reduce) una o más propiedades bioquímicas, físicas y/o farmacocinéticas del polipéptido de HRS con respecto a una composición sin el NaCl, o con respecto a una composición con una concentración de NaCl que se sitúa fuera de las cantidades o intervalos anteriores. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia de la
- 35 concentración definida de NaCl se despliega, se agrega o precipita a una velocidad que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces más lenta o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% más lenta que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin la concentración definida de NaCl.
- 40 En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del NaCl se despliega, se agrega o precipita a una velocidad que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces más lenta o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500%
- 45 más lenta que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el NaCl o con una concentración de NaCl que se sitúa fuera de las cantidades o intervalos anteriores.
- 50 En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia de la concentración definida de NaCl tiene una temperatura de fusión (T_f) que es al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% mayor que la temperatura de fusión de un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin la concentración definida de NaCl. En
- 55 algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia de la concentración definida de NaCl tiene una temperatura de fusión (T_f) que es al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50°C mayor que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin la concentración definida de NaCl o con una concentración de NaCl que se sitúa fuera de
- 60 las cantidades o intervalos anteriores. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición también comprende un tampón, tal como se describe anteriormente. En realizaciones específicas de la presente descripción,

el tampón es un tampón de histidina. En otras realizaciones de la presente descripción, el tampón es un tampón de citrato.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición de polipéptido de HRS tiene una concentración de NaCl comprendidas entre aproximadamente 140 mM a aproximadamente 240 mM y tiene pico o picos reducidos de peso molecular alto por análisis SE-HPLC que son al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces menores o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% menores que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el NaCl. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS comprende aproximadamente 140 mM a aproximadamente 280 mM de NaCl, un tampón de histidina que tiene un pH de aproximadamente 7,0-7,5, y tiene un contenido máximo de peso molecular alto por análisis SE-HPLC que es inferior a aproximadamente el 2% del pico principal después de 2 días de almacenamiento a 37°C. En aspectos específicos de la presente descripción, la composición de HRS tiene un contenido máximo de peso molecular alto que es inferior a aproximadamente el 1% del pico principal después de 2 días de almacenamiento a 37°C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición de polipéptido de HRS tiene una concentración de NaCl comprendidas entre aproximadamente 140 mM a aproximadamente 240 mM y tiene pico o picos reducidos de peso molecular bajo por análisis SE-HPLC que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces menor o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% menor que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el NaCl o con una concentración de NaCl que se sitúa fuera de aproximadamente 140 mM a aproximadamente 240 mM.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición de polipéptido de HRS tiene una concentración de NaCl comprendidas entre aproximadamente 140 mM a aproximadamente 240 mM y tiene turbiedad reducida (A340) que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces menor o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% menor que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el NaCl o con una concentración de NaCl que se sitúa fuera de aproximadamente 140 mM a aproximadamente 240 mM. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS comprende aproximadamente 140 mM a aproximadamente NaCl 280 mM, un tampón de histidina que tiene un pH de aproximadamente 7,0-7,5 y tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,5 después de 2 días de almacenamiento a 37°C. En aspectos específicos de la presente descripción, la composición de HRS tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,05 después de 2 días de almacenamiento a 37°C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes de ejemplo incluyen, sin limitación, sacarosa, manitol, trehalosa, sorbitol, arginina, glicina y glicerol. En algunas realizaciones de la presente descripción, el excipiente está presente a aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 ó 10% (p/v), lo que incluye todos los intervalos intermedios. En algunas realizaciones de la presente descripción, el excipiente está presente en un intervalo de aproximadamente 0,1-5,0, 0,1-4,5, 0,1-4,0, 0,1-3,5, 0,1-3,0, 0,1-2,5, 0,1-2,0, 0,1-1,5, 0,1-1,0, 0,1-0,5% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente 0,2-5,0, 0,2-4,5, 0,2-4,0, 0,2-3,5, 0,2-3,0, 0,2-2,5, 0,2-2,0, 0,2-1,5, 0,2-1,0, 0,2-0,5% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente 0,5-5,0, 0,5-4,5, 0,5-4,0, 0,5-3,5, 0,5-3,0, 0,5-2,5, 0,5-2,0, 0,5-1,5, 0,5-1,0% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente 1,0-5,0, 1,0-4,5, 1,0-4,0, 1,0-3,5, 1,0-3,0, 1,0-2,5, 1,0-2,0, 1,0-1,5% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente 1,5-5,0, 1,5-4,5, 1,5-4,0, 1,5-3,5, 1,5-3,0, 1,5-2,5, 1,5-2,0% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente 2,0-5,0, 2,0-4,5, 2,0-4,0, 2,0-3,5, 2,0-3,0, 2,0-2,5% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente 2,5-5,0, 2,5-4,5, 2,5-4,0, 2,5-3,5, 2,5-3,0% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente 3,0-5,0, 3,0-4,5, 3,0-4,0, 3,0-3,5% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente 3,5-5,0, 3,5-4,5, 3,5-4,0% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente 4,0-5,0, 4,0-4,5 ó 4,5-5,0% (p/v). En algunas

realizaciones de la presente descripción, el excipiente está presente en una concentración de aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390 ó 400 mM, lo que incluye todos los intervalos intermedios. En algunas realizaciones de la presente descripción, el excipiente está presente en un intervalo de concentración de

5 aproximadamente 50-400, 100-400, 150-400, 200-400, 250-400, 300-400, 350-400, 50-350, 100-350, 200-350, 250-350, 300-350, 50-300, 100-300, 150-300, 200-300, 250-300, 50-250, 100-250, 150-250, 200-250, 50-200, 100-200, 150-200, 50-150, 100-150 ó 50-100 mM.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la presencia de uno o más excipientes altera (por ejemplo, mejora, aumenta, disminuye, reduce) una o más propiedades bioquímicas, físicas y/o farmacocinéticas del polipéptido de HRS con respecto a una composición sin el excipiente o excipientes, o con respecto a una composición con una concentración de excipiente o excipientes que se sitúa fuera de las cantidades o intervalos anteriores. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del excipiente o excipientes se despliega a una velocidad que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces más lenta o al menos

15 aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% más lenta que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el excipiente o excipientes. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del excipiente o excipientes tiene una temperatura de fusión (T_f) que es al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% mayor que la temperatura de fusión de un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el excipiente o excipientes. En algunas

20 realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del excipiente o excipientes tiene una temperatura de fusión (T_f) que es al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50°C mayor que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el excipiente o excipientes. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición también comprende un tampón, tal como se describe anteriormente, y opcionalmente tiene una concentración definida de NaCl, tal como se describe anteriormente. En realizaciones específicas de la presente descripción, el tampón es un tampón de histidina. En otras realizaciones de la presente descripción, el tampón es un tampón de

30 citrato.

En algunas realizaciones de la presente descripción, una composición comprende uno o más tensioactivos. Los tensioactivos de ejemplo incluyen, sin limitación, polisorbatos y poloxámeros. Los polisorbatos son líquidos oleosos derivados de sorbitano PEGilado (un derivado de sorbitol) que son esterificados con ácidos grasos. Algunos

35 polisorbatos se comercializan con los nombres comerciales Alquest™, Canarcel™ y Tween™. Los polisorbatos de ejemplo incluyen Polisorbato 20 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano), Polisorbato 40 (monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitano), Polisorbato 60 (monoestearato de polioxietileno (20) sorbitano) y Polisorbato 80 (monooleato de polioxietileno (20) sorbitano). Los poloxámeros son copolímeros de tribloque no iónicos que comprenden una cadena hidrófoba central de polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) flanqueada por dos cadenas

40 hidrófilas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)). Algunos poloxámeros se comercializan con los nombres comerciales Syneronics™, Pluronic™ y Kolliphor™. En algunas realizaciones de la presente descripción, el tensioactivo está presente a aproximadamente el 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 ó 3,0% (p/v), lo que incluye todos los intervalos intermedios. En algunas realizaciones de la presente descripción, el

45 tensioactivo está presente en un intervalo de aproximadamente el 0,01-3,0, 0,01-2,5, 0,01-2,0, 0,01-1,5, 0,01-1,0, 0,01-1,5, 0,01-1,0, 0,01-0,5, 0,01-0,1% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente el 0,05-3,0, 0,05-2,5, 0,05-2,0, 0,05-1,5, 0,05-1,0, 0,05-1,5, 0,05-1,0, 0,05-0,5, 0,05-0,1% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente el 0,1-3,0, 0,1-2,5, 0,1-2,0, 0,1-1,5, 0,1-1,0, 0,1-1,5, 0,1-1,0, 0,1-0,5% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente el 0,5-3,0, 0,5-2,5, 0,5-2,0, 0,5-1,5, 0,5-1,0, 0,5-1,5, 0,5-1,0% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente el 1,0-3,0, 1,0-2,5,

50 1,0-2,0, 1,0-1,5% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente el 1,5-3,0, 1,5-2,5, 1,5-2,0% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente el 2,0-3,0, 2,0-2,5% (p/v), o en un intervalo de aproximadamente el 2,5-3,0% (p/v). En algunas realizaciones de la presente descripción, el tensioactivo es Polisorbato 20 (PS20). En algunas realizaciones de la presente descripción, el tensioactivo es el poloxámero Pluronic F68.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la presencia de uno o más tensioactivos altera (por ejemplo, mejora, aumenta, disminuye, reduce) una o más propiedades bioquímicas, físicas y/o farmacocinéticas del polipéptido de HRS con respecto a una composición sin el o los tensioactivos, o con respecto a una composición con una concentración de tensioactivo o tensioactivos que se sitúa fuera de las cantidades o intervalos anteriores. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del o los tensioactivos se

60 despliega, se agrega o precipita a una velocidad que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces más lenta o al

menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% más lenta que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el o los tensioactivos.

- 5 En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del o los tensioactivos se despliega, se agrega o precipita a una velocidad que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ó 200 veces más lenta o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% más lenta que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a
- 10 aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el o los tensioactivos.
- 15 En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del o los tensioactivos tiene una temperatura de fusión (T_f) que es al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% mayor que la temperatura de fusión de un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el o los tensioactivos. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS en presencia del o los tensioactivos tiene una temperatura de fusión (T_f) que es al
- 20 menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50°C mayor que un polipéptido de HRS correspondiente en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el o los tensioactivos. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición también comprende un tampón, tal como se describe anteriormente, y opcionalmente tiene una concentración definida de NaCl, tal como se describe
- 25 anteriormente, y opcionalmente comprende uno o más excipientes, tal como se describe anteriormente. En realizaciones específicas de la presente descripción, el tampón es un tampón de histidina. En otras realizaciones de la presente descripción, el tampón es un tampón de citrato.

- En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición de polipéptido de HRS en presencia del o los
- 30 tensioactivos tiene pico o picos reducidos de peso molecular alto por análisis SE-HPLC que son al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces menores o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% menores que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o
- 35 aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el o los tensioactivos.

- En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS comprende PS20, un tampón de histidina que tiene un pH de aproximadamente 7,0-7,5, y aproximadamente NaCl 140 mM, y tiene un contenido máximo de
- 40 peso molecular alto que es inferior a aproximadamente el 1% del pico principal por análisis SE-HPLC después de 7 días de almacenamiento a 37°C. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS tiene un contenido máximo de peso molecular alto que es inferior a aproximadamente el 0,5% del pico principal después de 7 días de almacenamiento a 37°C.

- 45 En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS comprende PS80, un tampón de histidina que tiene un pH de aproximadamente 7,0-7,5, y aproximadamente NaCl 140 mM, y tiene un contenido máximo de peso molecular alto que es inferior a aproximadamente el 2% del pico principal por análisis SE-HPLC después de 7 días de almacenamiento a 37°C. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS tiene un contenido máximo de peso molecular alto que es inferior a aproximadamente el 0,5% del pico principal después de 7
- 50 días de almacenamiento a 37°C.

- En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS comprende Pluronic F68, un tampón de histidina que tiene un pH de aproximadamente 7,0-7,5, y aproximadamente NaCl 140 mM, y tiene un contenido máximo de peso molecular alto que es inferior a aproximadamente el 1% del pico principal por análisis SE-HPLC
- 55 después de 7 días de almacenamiento a 37°C. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS tiene un contenido máximo de peso molecular alto que es inferior a aproximadamente el 0,5% del pico principal después de 7 días de almacenamiento a 37°C.

- En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición de polipéptido de HRS en presencia del o los
- 60 tensioactivos tiene pico o picos reducidos de peso molecular bajo por análisis SE-HPLC que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces menor o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%,

40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% menor que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el o los tensioactivos.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición de polipéptido de HRS en el o los tensioactivos tiene una turbiedad reducida (A340) que es al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces menor o al menos aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% o 500% menor que un polipéptido de HRS correspondiente cuando se incubaba a aproximadamente 5°C, o a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, ~20-25°C), o a aproximadamente 37°C durante aproximadamente o al menos aproximadamente 3 horas, o aproximadamente o al menos aproximadamente 3 días, o aproximadamente o al menos aproximadamente 7 días en una composición por lo demás idéntica o comparable sin el o los tensioactivos.

En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS comprende PS20, un tampón de histidina que tiene un pH de aproximadamente 7,0-7,5, y aproximadamente NaCl 140 mM, y tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,5 después de 7 días de almacenamiento a 37°C. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,2 después de 7 días de almacenamiento a 37°C.

En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS comprende PS80, un tampón de histidina que tiene un pH de aproximadamente 7,0-7,5, y aproximadamente NaCl 140 mM, y tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,5 después de 7 días de almacenamiento a 37°C. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,2 después de 7 días de almacenamiento a 37°C.

En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS comprende Pluronic F68, un tampón de histidina que tiene un pH de aproximadamente 7,0-7,5, y aproximadamente NaCl 140 mM, y tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,5 después de 7 días de almacenamiento a 37°C. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición de HRS tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,2 después de 7 días de almacenamiento a 37°C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, una composición comprende uno o más compuestos antioxidantes. Los antioxidantes de ejemplo incluyen, sin limitación, cisteína, metionina, N-acetilcisteína (NAC) y glutatión, tocoferoles, carotenos, ubiquinol y ácido ascórbico. En algunas realizaciones de la presente descripción, el compuesto antioxidante está presente en una concentración de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 ó 10 mM, lo que incluye todos los intervalos intermedios. En algunas realizaciones de la presente descripción, el compuesto antioxidante está presente en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,1-5,0, 0,1-4,5, 0,1-4,0, 0,1-3,5, 0,1-3,0, 0,1-2,5, 0,1-2,0, 0,1-1,5, 0,1-1,0, 0,1-0,5 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 0,2-5,0, 0,2-4,5, 0,2-4,0, 0,2-3,5, 0,2-3,0, 0,2-2,5, 0,2-2,0, 0,2-1,5, 0,2-1,0, 0,2-0,5 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 0,5-5,0, 0,5-4,5, 0,5-4,0, 0,5-3,5, 0,5-3,0, 0,5-2,5, 0,5-2,0, 0,5-1,5, 0,5-1,0 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 1,0-5,0, 1,0-4,5, 1,0-4,0, 1,0-3,5, 1,0-3,0, 1,0-2,5, 1,0-2,0, 1,0-1,5 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 1,5-5,0, 1,5-4,5, 1,5-4,0, 1,5-3,5, 1,5-3,0, 1,5-2,5, 1,5-2,0 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 2,0-5,0, 2,0-4,5, 2,0-4,0, 2,0-3,5, 2,0-3,0, 2,0-2,5 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 2,5-5,0, 2,5-4,5, 2,5-4,0, 2,5-3,5, 2,5-3,0 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 3,0-5,0, 3,0-4,5, 3,0-4,0, 3,0-3,5 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 3,5-5,0, 3,5-4,5, 3,5-4,0 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 4,0-5,0, 4,0-4,5 ó 4,5-5,0 mM.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende un agente de quelación. Los agentes de quelación de ejemplo incluyen, sin limitación, etilendiamintetraacetato (EDTA), ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N',N'-tetraacético (BAPTA) y ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS). En algunas realizaciones de la presente descripción, el agente de quelación está presente en una concentración de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 ó 5,0 mM, lo que incluye todos los intervalos intermedios. En algunas realizaciones de la presente descripción, el agente de quelación está presente en un intervalo de concentración de

aproximadamente 0,1-5,0, 0,1-4,5, 0,1-4,0, 0,1-3,5, 0,1-3,0, 0,1-2,5, 0,1-2,0, 0,1-1,5, 0,1-1,0, 0,1-0,5 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 0,2-5,0, 0,2-4,5, 0,2-4,0, 0,2-3,5, 0,2-3,0, 0,2-2,5, 0,2-2,0, 0,2-1,5, 0,2-1,0, 0,2-0,5 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 0,5-5,0, 0,5-4,5, 0,5-4,0, 0,5-3,5, 0,5-3,0, 0,5-2,5, 0,5-2,0, 0,5-1,5, 0,5-1,0 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 1,0-5,0, 1,0-4,5, 1,0-4,0, 1,0-3,5, 1,0-3,0, 1,0-2,5, 1,0-2,0, 1,0-1,5 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 1,5-5,0, 1,5-4,5, 1,5-4,0, 1,5-3,5, 1,5-3,0, 1,5-2,5, 1,5-2,0 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 2,0-5,0, 2,0-4,5, 2,0-4,0, 2,0-3,5, 2,0-3,0, 2,0-2,5 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 2,5-5,0, 2,5-4,5, 2,5-4,0, 2,5-3,5, 2,5-3,0 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 3,0-5,0, 3,0-4,5, 3,0-4,0, 3,0-3,5 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 3,5-5,0, 3,5-4,5, 3,5-4,0 mM, o un intervalo de concentración de aproximadamente 4,0-5,0, 4,0-4,5 ó 4,5-5,0 mM.

En algunas realizaciones de la presente descripción, una composición y/o el o los polipéptidos de HRS contenidos en el mismo se caracterizan por una o más propiedades físicas absolutas, tales como el grado de agregación de peso molecular alto (o formación de agregados), el aspecto o claridad (por ejemplo, turbiedad, opalescencia), el grado de homogeneidad o monodispersión, la solubilidad, la pureza de proteínas, la temperatura de fusión, la concentración de proteínas y/o el grado de fragmentación de proteínas.

En algunos aspectos de la presente descripción, una composición tiene un contenido agregado de aproximadamente o inferior a aproximadamente el 10% con respecto a la cantidad total de proteína presente, o en algunas realizaciones de la presente descripción una composición tiene un contenido de agregado de aproximadamente o inferior a aproximadamente el 9%, 8%, 7%, 6%, o 5%, o en algunos aspectos de la presente descripción una composición tiene un contenido de agregado de aproximadamente o inferior a aproximadamente el 4%, 3%, o 2% o en aspectos específicos de la presente descripción una composición tiene un contenido de agregado de aproximadamente o inferior a aproximadamente el 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% o 0,1%. En algunas realizaciones de la presente descripción, el contenido de agregado es contenido de agregado de peso molecular alto. El contenido de agregado de peso molecular alto puede determinarse mediante una variedad de técnicas analíticas, lo que incluye, por ejemplo, cromatografía por exclusión de tamaños (SE-HPLC), dispersión de luz dinámica, análisis de SDS-PAGE y ultracentrifugación analítica.

En algunos aspectos de la presente descripción, el aspecto de una composición es clara y carece de una formación importante de partículas o fibras. La claridad de una composición puede caracterizarse, por ejemplo, por turbiedad, opalescencia, o ambas. La turbiedad puede medirse por absorbancia a A340, y la opalescencia puede medirse por absorbancia a A580. En algunas realizaciones de la presente descripción, la turbiedad de una composición medida por absorbancia a A340 es aproximadamente o inferior a aproximadamente 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,009, 0,008, 0,007, 0,006, 0,005, 0,004, 0,003, 0,002 ó 0,001. En algunas realizaciones de la presente descripción, la opalescencia de una composición medida por absorbancia a A580 es aproximadamente o inferior a aproximadamente 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,009, 0,008, 0,007, 0,006, 0,005, 0,004, 0,003, 0,002 ó 0,001.

En algunos aspectos de la presente descripción, una composición comprende uno o más polipéptidos de HRS que son sustancialmente homogéneos o monodispersos, lo que significa que las composiciones de polipéptidos de HRS existen sustancialmente (por ejemplo, al menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o mayor) en una forma de peso molecular aparente cuando se evalúan, por ejemplo, por cromatografía de exclusión de tamaños, dispersión de luz dinámica, SDS-PAGE o ultracentrifugación analítica. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS existe sustancialmente como un monómero. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS existe sustancialmente como un dímero. En algunos aspectos de la presente descripción, dichas composiciones pueden comprender DTT u otros agentes reductores adecuados para reducir la formación de enlaces de disulfuro.

En algunas realizaciones de la presente descripción, los polipéptidos de HRS tienen una solubilidad que es conveniente para el modo de administración en particular, tal como administración intravenosa, administración subcutánea, etc. Los ejemplos de solubilidades deseables incluyen aproximadamente o al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 mg/ml, o aproximadamente o al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 mg/ml, o aproximadamente o al menos aproximadamente 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 ó 49 mg/ml, o aproximadamente o al menos aproximadamente 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 ó 60 mg/ml.

En algunos aspectos de la presente descripción, una composición tiene una pureza sobre una base de proteínas (por ejemplo, polipéptido de HRS con respecto a otras proteínas celulares) de aproximadamente o al menos aproximadamente el 90%, o en algunos aspectos de la presente descripción tiene una pureza sobre una base de

proteínas de aproximadamente o al menos aproximadamente el 95%, 96%, 97% o 98%, o en algunos aspectos de la presente descripción tiene una pureza sobre una base de proteínas de aproximadamente o al menos aproximadamente el 99% o 99,5%. La pureza puede determinarse por medio de cualquier procedimiento analítico rutinario tal como se conoce en la técnica.

5

En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS en una composición dada tiene una estabilidad térmica definida, caracterizada, por ejemplo, por la temperatura de fusión (Tf). En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS en una composición tiene una Tf de aproximadamente o al menos aproximadamente 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ó 70°C. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS en una composición tiene una Tf que está en el intervalo de aproximadamente 45-70, 46-70, 47-70, 48-70, 49-70, 50-70, 51-70, 52-70, 53-70, 54-70, 55-70, 56-70, 57-70, 58-70, 59-70, 60-70, 61-70, 62-70, 63-70, 64-70, 65-70, 66-70, 67-70, 68-70 ó 69-70°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-69, 46-69, 47-69, 48-69, 49-69, 50-69, 51-69, 52-69, 53-69, 54-69, 55-69, 56-69, 57-69, 58-69, 59-69, 60-69, 61-69, 62-69, 63-69, 64-69, 65-69, 66-69, 67-69, 68-69°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-68, 46-68, 47-68, 48-68, 49-68, 50-68, 51-68, 52-68, 53-68, 54-68, 55-68, 56-68, 57-68, 58-68, 59-68, 60-68, 61-68, 62-68, 63-68, 64-68, 65-68, 66-68, 67-68°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-67, 46-67, 47-67, 48-67, 49-67, 50-67, 51-67, 52-67, 53-67, 54-67, 55-67, 56-67, 57-67, 58-67, 59-67, 60-67, 61-67, 62-67, 63-67, 64-67, 65-67, 66-67°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-66, 46-66, 47-66, 48-66, 49-66, 50-66, 51-66, 52-66, 53-66, 54-66, 55-66, 56-66, 57-66, 58-66, 59-66, 60-66, 61-66, 62-66, 63-66, 64-66, 65-66°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-65, 46-65, 47-65, 48-65, 49-65, 50-65, 51-65, 52-65, 53-65, 54-65, 55-65, 56-65, 57-65, 58-65, 59-65, 60-65, 61-65, 62-65, 63-65, 64-65°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-64, 46-64, 47-64, 48-64, 49-64, 50-64, 51-64, 52-64, 53-64, 54-64, 55-64, 56-64, 57-64, 58-64, 59-64, 60-64, 61-64, 62-64, 63-64°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-63, 46-63, 47-63, 48-63, 49-63, 50-63, 51-63, 52-63, 53-63, 54-63, 55-63, 56-63, 57-63, 58-63, 59-63, 60-63, 61-63, 62-63°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-62, 46-62, 47-62, 48-62, 49-62, 50-62, 51-62, 52-62, 53-62, 54-62, 55-62, 56-62, 57-62, 58-62, 59-62, 60-62, 61-62°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-61, 46-61, 47-61, 48-61, 49-61, 50-61, 51-61, 52-61, 53-61, 54-61, 55-61, 56-61, 57-61, 58-61, 59-61, 60-61°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-60, 46-60, 47-60, 48-60, 49-60, 50-60, 51-60, 52-60, 53-60, 54-60, 55-60, 56-60, 57-60, 58-60, 59-60°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-59, 46-59, 47-59, 48-59, 49-59, 50-59, 51-59, 52-59, 53-59, 54-59, 55-59, 56-59, 57-59, 58-59°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-58, 46-58, 47-58, 48-58, 49-58, 50-58, 51-58, 52-58, 53-58, 54-58, 55-58, 56-58, 57-58°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-57, 46-57, 47-57, 48-57, 49-57, 50-57, 51-57, 52-57, 53-57, 54-57, 55-57, 56-57°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-56, 46-56, 47-56, 48-56, 49-56, 50-56, 51-56, 52-56, 53-56, 54-56, 55-56°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-55, 46-55, 47-55, 48-55, 49-55, 50-55, 51-55, 52-55, 53-55, 54-55°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-54, 46-54, 47-54, 48-54, 49-54, 50-54, 51-54, 52-54, 53-54°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-53, 46-53, 47-53, 48-53, 49-53, 50-53, 51-53, 52-53°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-52, 46-52, 47-52, 48-52, 49-52, 50-52, 51-52°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-51, 46-51, 47-51, 48-51, 49-51, 50-51°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-50, 46-50, 47-50, 48-50, 49-50°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-49, 46-49, 47-49, 48-49°C, o está en el intervalo de aproximadamente 45-48, 46-48, 47-48, 48-48, 49-48, 50-48, 51-48, 52-48, 53-48, 54-48, 55-48, 56-48, 57-48, 58-48, 59-48, 60-48, 61-48, 62-48, 63-48, 64-48, 65-48, 66-48, 67-48, 68-48, 69-48, 70-48, 71-48, 72-48, 73-48, 74-48, 75-48, 76-48, 77-48, 78-48, 79-48, 80-48, 81-48, 82-48, 83-48, 84-48, 85-48, 86-48, 87-48, 88-48, 89-48, 90-48, 91-48, 92-48, 93-48, 94-48, 95-48, 96-48, 97-48, 98-48, 99-48, 100-48°C. La temperatura de fusión puede determinarse por diversos procedimientos analíticos, lo que incluye, por ejemplo, fluorimetría de barrido diferencial (DSF).

En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS está presente en una composición para una concentración de proteínas definida. Por ejemplo, algunas composiciones tienen una concentración del polipéptido o los polipéptidos de HRS de aproximadamente o al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 mg/ml. Algunas composiciones tienen una concentración del polipéptido o los polipéptidos de HRS que está en el intervalo de aproximadamente 5-100, 10-100, 15-100, 20-100, 25-100, 30-100, 35-100, 40-100, 45-100, 50-100, 55-100, 60-100, 70-100, 80-100, 90-100 mg/ml, o de aproximadamente 5-90, 10-90, 15-90, 20-90, 25-90, 30-90, 35-90, 40-90, 45-90, 50-90, 55-90, 60-90, 70-90, 80-90 mg/ml, o de aproximadamente 5-80, 10-80, 15-80, 20-80, 25-80, 30-80, 35-80, 40-80, 45-80, 50-80, 55-80, 60-80, 70-80 mg/ml, o de aproximadamente 5-70, 10-70, 15-70, 20-70, 25-70, 30-70, 35-70, 40-70, 45-70, 50-70, 55-70, 60-70 mg/ml, o de aproximadamente 5-60, 10-60, 15-60, 20-60, 25-60, 30-60, 35-60, 40-60, 45-60, 50-60, 55-60 mg/ml, o de aproximadamente 5-50, 10-50, 15-50, 20-50, 25-50, 30-50, 35-50, 40-50, 45-50 mg/ml, o de aproximadamente 5-45, 10-45, 15-45, 20-45, 25-45, 30-45, 35-45, 40-45 mg/ml, o de aproximadamente 5-40, 10-40, 15-40, 20-40, 25-40, 30-40, 35-40 mg/ml, o de aproximadamente 5-35, 10-35, 15-35, 20-35, 25-35, 30-35 mg/ml, o de aproximadamente 5-30, 10-30, 15-30, 20-30, 25-30 mg/ml, o de aproximadamente 5-25, 10-25, 15-25, 20-25, 25-25, 30-25, 35-25, 40-25, 45-25, 50-25, 55-25, 60-25, 65-25, 70-25, 75-25, 80-25, 85-25, 90-25, 95-25, 100-25°C.

En algunos aspectos de la presente descripción, una composición tiene un grado de fragmentación de proteínas de menos de aproximadamente el 10% con respecto a la cantidad total de proteína presente, o en algunas

realizaciones de la presente descripción una composición tiene un grado de fragmentación de proteínas de menos de aproximadamente el 9%, 8%, 7%, 6% o 5%, o en algunos aspectos de la presente descripción una composición tiene un grado de fragmentación de proteínas de menos de aproximadamente el 4%, 3% o 2%, o en aspectos específicos de la presente descripción una composición tiene un grado de fragmentación de proteínas de menos de aproximadamente el 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% o 0,1%. La fragmentación de proteínas puede medirse por diversas técnicas analíticas, lo que incluye, por ejemplo, cromatografía de exclusión de tamaños, análisis de SDS-PAGE y ultracentrifugación analítica.

En realizaciones específicas de la presente descripción, la composición terapéutica comprende al menos un polipéptido de HRS sustancialmente puro, opcionalmente a una concentración de al menos aproximadamente 10-50 mg/ml, histidina 40-50 mM aproximadamente (por ejemplo, L-histidina), NaCl 140-240 mM aproximadamente, trehalosa aproximadamente al 1-2%, Polisorbato 20 (PS20) aproximadamente al 0,20-0,05%, tiene un pH de aproximadamente 7,0-7,5 y está sustancialmente libre de endotoxinas. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica se caracteriza por un contenido máximo de peso molecular alto que es inferior a aproximadamente el 1% del pico principal por análisis SE-HPLC después de 7 días de almacenamiento a 37°C. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica tiene un contenido máximo de peso molecular alto que es inferior a aproximadamente el 0,5% del pico principal por análisis SE-HPLC después de 7 días de almacenamiento a 37°C. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica se caracteriza por una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,5 después de 7 días de almacenamiento a 37°C. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,2 después de 7 días de almacenamiento a 37°C.

En otras realizaciones de la presente descripción, la composición comprende al menos un polipéptido de HRS sustancialmente puro, opcionalmente a una concentración de al menos 10-50 mg/ml aproximadamente, histidina 40-50 mM aproximadamente (por ejemplo, L-histidina), NaCl aproximadamente 140-240 mM, sacarosa aproximadamente al 1-2%, Polisorbato 20 (PS20) aproximadamente al 0,01-0,05%, tiene un pH de aproximadamente 7,3 y está sustancialmente libre de endotoxinas. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica se caracteriza por un contenido máximo de peso molecular alto que es inferior a aproximadamente el 1% del pico principal por análisis SE-HPLC después de 7 días de almacenamiento a 37°C. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica tiene un contenido máximo de peso molecular alto por análisis SE-HPLC que es inferior a aproximadamente el 0,5% del pico principal después de 7 días de almacenamiento a 37°C. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica se caracteriza por una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,5 después de 7 días de almacenamiento a 37°C. En algunos aspectos de la presente descripción, la composición terapéutica tiene una turbiedad (A340) que es inferior a aproximadamente 0,2 después de 7 días de almacenamiento a 37°C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende, consiste en o consiste esencialmente en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-23, 39, 41, 43, 70-71, 74-153, 160-172 ó 176-182, o un polipéptido de HRS recogido en cualquiera de las **Tablas 1-9** o deducible a partir de ellas, que incluye variantes de los mismos. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS es HRS(1-506) o HRS(2-506), o una variante de los mismos, que tiene una Tf en la composición de al menos aproximadamente 58, 59, 60 ó 61°C.

Las propiedades bioquímicas, físicas y/o farmacocinéticas de las composiciones de polipéptidos de HRS descritas en la presente memoria pueden caracterizarse en cualquier conjunto definido de condiciones, tales como temperatura, pH u otra condición, y opcionalmente en cualquier momento dado o durante un periodo de tiempo. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente descripción, dichas propiedades se caracterizan a una temperatura de aproximadamente -80, -60, -40, -20, -10, -5, -4, -3, -20, -2, -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 ó 100°C, que incluye todos los números enteros e intervalos intermedios. En algunas realizaciones de la presente descripción, dichas propiedades se caracterizan a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, 20-25°C). Dichas propiedades también pueden caracterizarse durante un periodo de tiempo, por ejemplo, durante un periodo de aproximadamente 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 horas, o durante un periodo de aproximadamente 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 días, o durante un periodo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ó 24 semanas, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 meses o así aproximadamente. En algunas realizaciones de la presente descripción, dichas propiedades se caracterizan después de la congelación/descongelación de la composición al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables de un polipéptido de HRS. Para una revisión sobre sales adecuadas, véase *Handbook of Pharmaceutical Sales: Properties, Selection, and Use*

de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, 2002). Las sales básicas adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas. Los ejemplos representativos incluyen sales de aluminio, arginina, benzatina, calcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnesio, meglumina, olamina, potasio, sodio, trometamina y cinc. También pueden formarse las hemisales de ácidos y bases, por ejemplo, sales de hemisulfato y hemicalcio. Las composiciones que se usarán en la presente descripción adecuadas para administración parenteral pueden comprender soluciones acuosas estériles y/o suspensiones de los ingredientes farmacéuticamente activos preferentemente convertidos en isotónicos con la sangre del receptor, usando en general cloruro de sodio, glicerina, glucosa, manitol, sorbitol y similares. Los ácidos orgánicos adecuados para formar sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido palmítico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácidos alquilsulfónicos (por ejemplo, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, etc.), ácidos arilsulfónicos (por ejemplo, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido alcanforsulfónico, etc.), ácido 4-metilbencil(2,2,2)-oct-2-en-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares.

En realizaciones particulares de la presente descripción, el vehículo puede incluir agua. En algunas realizaciones de la presente descripción, el vehículo puede ser una solución acuosa de solución salina, por ejemplo, agua que contiene concentraciones fisiológicas de sodio, potasio, calcio, magnesio y cloruro a un pH fisiológico. En algunas realizaciones de la presente descripción, el vehículo puede ser agua y la formulación puede incluir además NaCl. En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación puede ser isotónica. En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación puede ser hipotónica. En otras realizaciones de la presente descripción, la formulación puede ser hipertónica. En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación puede ser isoosmótica. En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación está libre sustancialmente de polímeros (por ejemplo, polímeros de formación de gel, agentes poliméricos de refuerzo de la viscosidad, etc.). En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación está libre sustancialmente de agentes de aumento de la viscosidad (por ejemplo, carboximetilcelulosa, polímeros polianiónicos, etc.). En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación está libre sustancialmente de polímeros de formación de gel. En algunas realizaciones de la presente descripción, la viscosidad de la formulación es aproximadamente la misma que la viscosidad de una solución salina que contiene la misma concentración de un polipéptido de HRS (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo).

En las composiciones farmacéuticas de la presente descripción, la formulación de excipientes farmacéuticamente aceptables y soluciones de vehículo es bien conocida para los expertos en la materia, como el desarrollo de regímenes posológicos y terapéuticos adecuados para el uso de las composiciones particulares descritas en la presente memoria en diversos regímenes de tratamiento, lo que incluye por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular.

En algunas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden suministrarse por medio de administración oral para un sujeto. De este modo, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o pueden confinarse en cápsula de gelatina dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el suministro de polipéptidos de HRS y procedimientos para su preparación serán muy evidentes para los expertos en la materia. Dichas composiciones y procedimientos para su preparación pueden encontrarse, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª edición (Mack Publishing Company, 1995).

La administración de una dosis terapéutica de un polipéptido de HRS puede realizarse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en las técnicas medicinales, lo que incluye por ejemplo, administración oral, rectal, intranasal, parenteral intravítrea, subconjuntival, subcapsular, retrobulbar, supracoroidea intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular, intrasinovial, intraocular, tópica y subcutánea. Los dispositivos adecuados para administración parenteral incluyen inyectores con aguja (que incluye microaguja), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

Las formulaciones parenterales son normalmente soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, hidratos de carbono y agentes de tampón (preferentemente a un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, pueden estar formuladas de forma más adecuada como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para su uso en conjunción con un vehículo adecuado tal como agua estéril sustancialmente libre de

pirógenos o sin pirógenos. La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, por ejemplo, por liofilización, pueden conseguirse fácilmente con técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas para los expertos en la materia.

- 5 Las formulaciones para administración parenteral pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o sostenida. Las composiciones de liberación sostenida incluyen liberación retardada, modificada, pulsada, controlada, dirigida y programada. Así un polipéptido de HRS puede formularse como una suspensión o como un sólido, semisólido o líquido tixotrópico para la administración como un depot implantado que proporciona liberación sostenida de polipéptidos de HRS. Los ejemplos de dichas formulaciones incluyen sin limitación, stents recubiertos con fármaco y
- 10 semisólidos y suspensiones que comprenden ácido poli(DL-láctico-co-glucólico) (PGLA) recubierto con fármaco, poli(DL-láctido-co-glucólido) (PLG) o vesículas laminares o micropartículas de poli(láctida) (PLA), hidrogeles (Hoffman AS: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 944: 62-73 (2001)), sistemas de nanopartículas de poli-aminoácidos, tales como el sistema Medusa desarrollado por Flamel Technologies Inc., sistemas de geles no acuosos tales como Atrigel desarrollado por Atrix, Inc., y SABER (liberación extendida de acetato isobutirato de sacarosa) desarrollado por
- 15 Durect Corporation, y sistemas basados en lípidos tales como DepoFoam desarrollado por SkyePharma.

- Tal como se indica anteriormente, las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezcladas de forma adecuada con un tensioactivo, tales como hidroxipropilcelulosa, Polisorbato (por ejemplo, Polisorbato 20, Polisorbato 80) o Pluronic F68. Las
- 20 dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones comunes de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

- Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y
- 25 polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles (patente de EE.UU. nº 5.466.468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil capacidad de uso de jeringas. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede incluir un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol,
- 30 propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede facilitarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos,
- 35 será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse con el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

- Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar tamponada
- 40 adecuadamente si fuera necesario y el diluyente líquido se convertirá primero en isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas en particular son adecuadas especialmente para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En esta relación, un medio acuoso estéril que puede emplearse será conocido para los expertos en la materia a partir de la presente descripción. Por ejemplo, puede disolverse una dosificación en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse 1.000 ml de líquido de hipodermoclastia o
- 45 inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15ª edición, pág. 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se producirá cierta variación en la dosificación dependiendo del estado del sujeto sometido a tratamiento. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Por otra parte, para administración humana, las preparaciones deben reunir esterilidad, pirogenia y las normas generales de seguridad y pureza requeridas por las normas de FDA
- 50 Office of Biologics.

- Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con los otros diversos ingredientes enumerados anteriormente, según se necesite, seguido por esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos
- 55 ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril filtrada previamente del mismo.

- 60 Las composiciones descritas en la presente memoria pueden formularse en forma neutra o de sal. Las sales

- farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que están formadas por ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco, y similares.
- 10 Tal como se usa en la presente memoria, "vehículo" incluye cualquiera y la totalidad de disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, excipientes, modificadores de la fuerza iónica, tensioactivos, tampones, soluciones de vehículos, suspensiones, coloides y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Salvo cuando algún medio o agente convencional sea incompatible con el
- 15 ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse en las composiciones ingredientes activos suplementarios.

- La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción alérgica o desfavorable similar cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo es bien conocida en la técnica. Normalmente, dichas composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación puede estar también emulsionada.
- 20 Los procedimientos de formulación son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19ª edición (1995). Las composiciones y agentes proporcionados en la presente memoria pueden administrarse de acuerdo con los procedimientos de la presente descripción en cualquier régimen posológico terapéuticamente efectivo. La cantidad y la frecuencia de la dosificación se seleccionan de manera que se crea un nivel efectivo del agente sin efectos perjudiciales. La cantidad efectiva de un compuesto de la presente descripción dependerá de la vía de administración, el tipo de animal de sangre caliente tratado y las características físicas del animal de sangre caliente específico en consideración. Estos factores y su relación para determinar esta cantidad son bien conocidos para los expertos en las técnicas médicas. Esta cantidad y el procedimiento de administración pueden adaptarse para conseguir una eficacia óptima pero dependerán de factores tales como el peso, la dieta, la medicación concurrente y otros factores que los expertos en
- 30 las técnicas médicas reconocerán.

- En algunas realizaciones de la presente descripción, las composiciones farmacéuticas pueden suministrarse por nebulizadores intranasales, inhalación y/o otros vehículos de suministro de aerosoles. Los procedimientos para suministrar composiciones de genes, polinucleótidos y péptido directamente a los pulmones por medio de nebulizadores de aerosol nasales se ha descrito por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.756.353 y la patente de EE.UU. nº 5.804.212. De forma similar, el suministro de fármacos usando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga y col., 1998) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (patente de EE.UU. nº 5.725.871) son también bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. De forma similar, el suministro de fármacos transmucoso en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente de EE.UU. nº 5.780.045.
- 40

- En algunas realizaciones de la presente descripción, el suministro puede producirse mediante el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas de lípidos, vesículas, y similares, para la introducción de las composiciones de la presente descripción en células hospedadoras adecuadas. En particular, las composiciones de la presente descripción pueden formularse para el suministro ya sea encapsulado en una partícula de lípidos, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similares. La formulación y el uso de dichos vehículos de suministro pueden realizarse usando técnicas conocidas y convencionales.
- 50

- En algunas realizaciones de la presente descripción, los agentes proporcionados en la presente memoria pueden unirse a un sustrato sólido farmacéuticamente aceptable, que incluye sustratos biocompatibles y biodegradables tales como polímeros y matrices. Los ejemplos de dichos sustratos sólidos incluyen, sin limitación, poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de L-ácido glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de vinilileno no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico, colágeno, metal, hidroxiapatita, vidrio biológico, aluminato, materiales biocerámicos y proteínas purificadas.
- 60

En una realización particular de la presente descripción, el sustrato sólido comprende un polímero biodegradable tal como el comercializado con el nombre de Atrigel® (QLT, Inc., Vancouver, B.C.). El sistema de suministro del fármaco Atrigel® consiste en polímeros biodegradables disueltos en vehículos biocompatibles. Las sustancias farmacéuticas pueden combinarse en este sistema de suministro líquido en el momento de la fabricación o, dependiendo del producto, pueden ser añadidas más tarde por el médico en el momento de la utilización. Cuando el producto líquido se inyecta en el espacio subcutáneo a través de una aguja de pequeño calibre o se coloca en puntos de tejido accesibles a través de una cánula, el agua de los fluidos del tejido hace que el polímero precipite y atrapa el fármaco en un implante sólido. A continuación el fármaco encapsulado en el implante se libera de forma controlada a medida que la matriz de polímero se biodegrada con el tiempo.

En realizaciones particulares de la presente descripción, la cantidad del agente de la composición de HRS administrado estará comprendida en general entre una dosificación de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg/día, y normalmente de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg cuando se administra por vía oral o intravenosa. En realizaciones particulares de la presente descripción, la dosificación es de 1 mg/kg o 5,0 mg/kg. Para seres humanos, la dosificación diaria usada puede estar comprendida desde aproximadamente 0,1 mg/kg a 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a 5 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg a 10 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a 20 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg a 30 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg a 50 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg a 100 mg/kg/24 horas.

En algunas realizaciones de la presente descripción, se administra una composición o agente en una dosificación única de 0,1 a 10 mg/kg o 0,5 a 15 mg/kg. En otras realizaciones de la presente descripción, se administra una composición o agente en una dosificación de 0,1 a 1 mg/kg/día, 0,5 a 2 mg/kg/día, o 5 a 20 mg/kg/día, o aproximadamente 20 a 80 mg/kg/día, o aproximadamente 80 a 150 mg/kg/día.

En varias realizaciones de la presente descripción, la dosificación es de aproximadamente 50-2.500 mg al día, 100-2.500 mg/día, 300-1.800 mg/día, o 500-1.800 mg/día. En una realización de la presente descripción, la dosificación está entre aproximadamente 100 a 600 mg/día. En otra realización de la presente descripción, la dosificación está entre aproximadamente 300 y 1.200 mg/día. En realizaciones particulares de la presente descripción, la composición o agente se administra a una dosificación de 100 mg/día, 240 mg/día 300 mg/día, 600 mg/día, 1.000 mg/día, 1.200 mg/día o 1.800 mg/día, en una o más dosis al día (es decir, donde las dosis combinadas alcanzan la dosificación diaria deseada). En realizaciones relacionadas de la presente descripción, la dosificación es de 200 mg dos veces al día, 300 mg dos veces al día, 400 mg dos veces al día, 500 mg dos veces al día, 600 mg dos veces al día o 700 mg dos veces al día, 800 mg dos veces al día, 900 mg dos veces al día o 1.000 mg dos veces al día. En varias realizaciones de la presente descripción, la composición o agente se administra en dosis única o repetida. La dosificación inicial y las dosificaciones posteriores pueden ser iguales o diferentes.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la dosis total administrada puede ser de aproximadamente 0,001 mg, aproximadamente 0,005 mg, aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,1 mg, 0,5 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 500 mg, 1.000 mg, aproximadamente 2.000 mg, aproximadamente 3.000 mg, aproximadamente 4.000 mg, aproximadamente 5.000 mg, aproximadamente 6.000 mg, aproximadamente 7.000 mg, aproximadamente 8.000 mg, aproximadamente 9.000 mg, aproximadamente 10.000 mg/intervalo de dosificación (por ejemplo, cada 24 horas). En algunas realizaciones de la presente descripción, el intervalo de dosificación puede ser una vez cada día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez cada cuatro días, una vez cada cinco días, una vez por semana o una vez cada dos semanas. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo del estado, el tratamiento se mantiene hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El curso de estas y otras terapias (por ejemplo, terapias *ex vivo*) puede vigilarse fácilmente mediante procedimientos y ensayos convencionales y basándose en criterios conocidos por el médico u otros expertos en la materia.

Se observará además que para dispositivos y composiciones de suministro sostenido la dosis total de HRS contenida en dicho sistema de suministro será consiguientemente mayor dependiendo del perfil de liberación del sistema de liberación sostenida. Así, una composición o dispositivo de liberación sostenida que estén destinados a suministrar el polipéptido de HRS durante un periodo de 5 días comprenderá normalmente al menos aproximadamente de 5 a 10 veces la dosis diaria de polipéptido de HRS; una composición o dispositivo de liberación sostenida que estén destinados para suministrar un péptido de HRS durante un periodo de 365 días comprenderá normalmente al menos aproximadamente de 400 a 800 veces la dosis diaria del polipéptido de HRS (dependiendo

de la estabilidad y la biodisponibilidad del polipéptido de HRS cuando se administra usando el sistema de liberación sostenida).

En algunas realizaciones de la presente descripción, una composición o agente se administra por vía intravenosa, por ejemplo, por infusión durante un periodo de tiempo de aproximadamente, por ejemplo, 10 minutos a 90 minutos. En otras realizaciones relacionadas de la presente descripción, una composición o agente se administra por infusión continua, por ejemplo, a una dosificación de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 mg/kg/h durante un periodo de tiempo. Mientras el periodo de tiempo puede variar, en algunas realizaciones de la presente descripción el periodo de tiempo puede estar entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 24 horas o entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente tres días.

En realizaciones particulares de la presente descripción, una cantidad efectiva o cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad suficiente para conseguir una concentración total de la composición o agente en el plasma sanguíneo de un sujeto con una C_{max} de entre aproximadamente 0,1 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml o entre aproximadamente 0,3 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml. En algunas realizaciones de la presente descripción, una dosificación oral es una cantidad suficiente para conseguir una concentración de plasma sanguíneo (C_{max}) de entre aproximadamente 0,1 µg/ml y aproximadamente 5 µg/ml o entre aproximadamente 0,3 µg/ml y aproximadamente 3 µg/ml. En algunas realizaciones de la presente descripción, una dosificación intravenosa es una cantidad suficiente para conseguir una concentración de plasma sanguíneo (C_{max}) de entre aproximadamente 1 µg/ml y aproximadamente 10 µg/ml o entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 6 µg/ml. En una realización relacionada de la presente descripción, la concentración total de un agente en el plasma sanguíneo del sujeto tiene una concentración mínima media de menos de aproximadamente 20 µg/ml y/o una concentración en estado estacionario de menos de aproximadamente 20 µg/ml. En una realización adicional de la presente descripción, la concentración total de un agente en el plasma sanguíneo del sujeto tiene una concentración mínima media de menos de aproximadamente 10 µg/ml y/o una concentración en estado estacionario de menos de aproximadamente 10 µg/ml.

En otra realización más de la presente descripción, la concentración total de un agente en el plasma sanguíneo del sujeto tiene una concentración mínima media de entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 10 µg/ml y/o una concentración en estado estacionario de entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 10 µg/ml. En una realización de la presente descripción, la concentración total de un agente en el plasma sanguíneo del sujeto tiene una concentración mínima media de entre aproximadamente 0,3 µg/ml y aproximadamente 3 µg/ml y/o una concentración en estado estacionario de entre aproximadamente 0,3 µg/ml y aproximadamente 3 µg/ml.

En realizaciones particulares de la presente descripción, una composición o agente se administra en una cantidad suficiente para conseguir en el mamífero una concentración de plasma sanguíneo que tienen una concentración mínima media de entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 10 µg/ml y/o una concentración en estado estacionario de entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 10 µg/ml. En realizaciones relacionadas de la presente descripción, la concentración total del agente en el plasma sanguíneo del mamífero tiene una concentración mínima media de entre aproximadamente 0,3 µg/ml y aproximadamente 3 µg/ml y/o una concentración en estado estacionario de entre aproximadamente 0,3 µg/ml y aproximadamente 3 µg/ml.

En realizaciones particulares de la presente descripción, la cantidad efectiva de una composición o agente, o la concentración de plasma sanguíneo de composición o agente se consigue o se mantiene, por ejemplo, durante al menos 15 minutos, al menos 30 minutos, al menos 45 minutos, al menos 60 minutos, al menos 90 minutos, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos una semana, al menos 2 semanas, al menos un mes, al menos 2 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos un año, al menos 2 años o más de 2 años.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la cantidad de polipéptido administrada estará normalmente en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg o de aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, aproximadamente 0,1-15 mg/kg/dosis) de polipéptido puede ser una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Por ejemplo, un régimen posológico puede comprender la administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido por una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del polipéptido, o aproximadamente la mitad de la dosis de carga. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes posológicos. Una dosificación diaria típica puede estar comprendida entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para

administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo del estado, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas. En realizaciones particulares de la presente descripción, la dosificación efectiva consigue los niveles de plasma sanguíneo o una concentración mínima media de una composición o agente descrita en la presente memoria. Esto puede determinarse fácilmente usando procedimientos rutinarios.

En realizaciones particulares de la presente descripción, la dosificación efectiva consigue los niveles de plasma sanguíneo o la concentración mínima media de una composición o agente descrito en la presente memoria. Esto puede determinarse fácilmente usando procedimientos rutinarios.

En algunas realizaciones, la composición puede incluir también uno o más adyuvantes, por ejemplo, cuando se emplean las composiciones inmunógenas terapéuticas como vacunas. Los adyuvantes son sustancias que mejoran o potencian de forma no específica la respuesta inmunitaria (por ejemplo, respuestas inmunitarias mediadas por CTL y linfocitos T auxiliares (T_H)) para un antígeno, y así se considerarían útiles en las composiciones terapéuticas de la presente descripción. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a 1018 ISS, sales de aluminio, Amplivax, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, flagelina o ligandos TLR5 derivados de la flagelina, ligando FLT3, GM-C SF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA), ImuFact IMP321, Interferón-alfa o beta, o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune, LipoVac, MALP2, MF59, monofosforilo lípido A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel®, micropartículas PLG, resiquimod, SRL172, virosomas y otras partículas semejantes a virus, YF-17D, trampa VEGF, R848, beta-glucano, Pam3Cys, Aquila QS21 estimulón, que se obtiene de saponina, extractos micobacterianos y emuladores sintéticos de la pared celular bacteriana, y otros adyuvantes de propiedad exclusiva tales como Ribi's Detox, Quil, o Superfos. Se prefieren adyuvantes tales como Freund o GM-CSF. Varios adyuvantes inmunológicos (por ejemplo, MF59) específicos para células dendríticas y su preparación se han descrito anteriormente (Dupuis M y col. 1998; Allison 1998). También pueden usarse citocinas. Varias citocinas se han relacionado directamente con la influencia en la migración de células dendríticas en tejidos linfoides (por ejemplo, TNF- α), que aceleran la maduración de células dendríticas en células de presentación de antígenos eficientes para linfocitos T (por ejemplo, GM-CSF, IL-1 e IL-4) (patente de EE.UU. nº 5.849.589) y que actúan como inmunoadyuvantes (por ejemplo, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich y col. 1996).

Se ha indicado también que los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG potencian los efectos de los adyuvantes en la preparación de una vacuna. Sin querer estar limitados por ninguna teoría, los oligonucleótidos CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) por medio de receptores de tipo Toll (TLR), principalmente TLR9. La activación de TLR9 provocada por CpG mejora las respuestas celulares y humores específicas de antígenos para una amplia variedad de antígenos, lo que incluye antígenos de péptidos o proteínas, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas celulares autólogas y conjugados de polisacáridos en vacunas profilácticas y terapéuticas. De forma más importante mejora la maduración y diferenciación de las células dendríticas, para producir una activación mejorada de linfocitos T_H1 y una intensa generación de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso en ausencia de linfocitos T CD4 auxiliares. El sesgo T_H1 inducido por la estimulación de TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes de vacunas tales como alúmina o adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo T_H2 . Los oligonucleótidos CpG muestran una actividad de adyuvante todavía mayor cuando se formulan o coadministran con otros adyuvantes o en formulaciones tales como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son necesarias especialmente para inducir una respuesta intensa cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno en aproximadamente dos órdenes de magnitud, con respuestas de anticuerpos comparables a la vacuna de dosis completa sin CpG en algunos experimentos (Arthur M. Krieg, Nature Reviews, Drug Discovery, 5, junio de 2006, 471-484). La patente de EE.UU. nº 6.406.705-B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos CpG, adyuvantes no de ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígenos. Un antagonista TLR9 de CpG disponible comercialmente es dSLIM (double Stem Loop Immunomodulator) de Mologen (Berlín, Alemania), que es un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente descripción. También pueden usarse otras moléculas de unión a TLR tales como ARN de unión a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Otros ejemplos para de adyuvantes útiles incluyen, pero no se limitan a CpG modificados químicamente (por ejemplo, CpR, Idera), Poli(I:C), tales como AmpliGen, ADN o ARN bacteriano no de CpG así como moléculas pequeñas inmunoactivas y anticuerpos tales como ciclofosfamida, sunitinib, bavacizumab, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafinib, XL-999, CP-547632, pazopanib, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4 y SC58175, que pueden actuar terapéuticamente y/o como un adyuvante. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente descripción pueden ser determinados fácilmente por el experto en la materia sin experimentación innecesaria.

Terapias de combinación

La presente descripción también incluye terapias de combinación que comprenden la administración a un paciente en dosis terapéutica de un polipéptido de HRS, o un reactivo de bloqueo de anticuerpos en combinación con un segundo agente activo, o un dispositivo o un procedimiento para tratar enfermedades autoinmunitarias, enfermedad(es) inflamatoria(s), distrofias musculares, rabdomiólisis, caquexia y otras enfermedades descritas en la presente memoria. En este contexto "administrado en combinación" significa: (1) parte de la misma forma de dosificación unitaria; (2) administración por separado, pero como parte del mismo régimen o programa de tratamiento terapéutico, normalmente pero no necesariamente, en el mismo día.

En algunos aspectos de la presente descripción de estas terapias de combinación, el segundo agente activo se selecciona de entre una o más anti-histaminas, uno o más agentes antiinflamatorios, uno o más anti-agentes antineoplásicos, uno o más agentes inmunosupresores, uno o más agentes antivíricos, uno o más agentes que inhiben los linfocitos B, bloquean la diferenciación de linfocitos B o la activación de linfocitos B de memoria, o uno o más agentes antioxidantes. Los agentes farmacológicos o terapéuticos que pueden encontrar uso en combinación con los polipéptidos de HRS descritos en la presente memoria, incluyen, sin limitación, los descritos en la patente de EE.UU. nº 4.474.451, columnas 4-6 y en la patente de EE.UU. nº 4.327.725, columnas 7-8.

Los ejemplos de anti-histaminas incluyen, pero no se limitan a, loradatina, hidroxicina, difenhidramina, clorfeniramina, bromfeniramina, ciproheptadina, terfenadina, clemastina, triprolidina, carbinoxamina, difenilpiralina, fenindamina, azatadina, tripelenamina, dexclorfeniramina, dexbromfeniramina, metdilacina y trimpricina doxilamina, feniramina, pirilamina, clorciclicina, toncilamina y derivados de las mismas.

Los ejemplos de agentes antineoplásicos incluyen, pero no se limitan a antibióticos y análogos (por ejemplo, aclacinomicinas, actinomicina f₁, antramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carrubicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, menogarilo, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, pirarrubicina, plicamicina, porfiromicina, puomicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, zinostatina, zorrubicina), antimetabolitos (por ejemplo, análogos del ácido fólico (por ejemplo, denopterina, edatrexato, metotrexato, piritrexim, pteropterina, Tomudex®, trimetrexato), análogos de la purina (por ejemplo, cladribina, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina), análogos de la pirimidina (por ejemplo, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, doxifluridina, emitefur, enocitabina, floxuridina, fluorouracilo, gemcitabina, tagafur).

Los ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen pero no se limitan a agentes antiinflamatorios esteroideos y agentes antiinflamatorios no esteroideos. Los agentes antiinflamatorios esteroideos de ejemplo incluyen acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluazacort, fluclosonida, flumetasona, flunisolida, fluocinolona acetona, fluocinonida, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorometolona, acetato de fluprednoleno, acetato de fluprednoleno, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, etabonato de loteprednol, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, furoato de mometasona, parametasona, prednicarato, prednisolona, 25-dietilamino-acetato de prednisolona, fosfato de sodio prednisolona, prednisona, prednival, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, triamcinolona acetona, triamcinolona benetonida y triamcinolona hexacetona.

Los agentes antiinflamatorios no esteroideos de ejemplo incluyen derivados del ácido aminoarilcarboxílico (por ejemplo, ácido enfenámico, etofenamato, ácido flufenámico, isonixina, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico, talniflumato, terofenamato, ácido tolfenámico), derivados del ácido arilacético (por ejemplo, aceclofenaco, acemetacina, alclofenaco, amfenaco, amtolmetina guacilo, bromfenaco, bufexamaco, cinmetacina, clopiraco, diclofenaco de sodio, etodolaco, felbinaco, ácido fenclórico, fentiazaco, glucametacina, ibufenaco, indometacina, isofezolaco, isoxepaco, lonazolaco, ácido metiacínico, mofezolaco, oxametacina, pirazolaco, proglumetacina, sulindaco, tiaramida, tolmetina, tropesina, zomepirac), derivados del ácido arilbutírico (por ejemplo, bumadizón, butibufeno, fenbufeno, xenbucina), ácidos arilcarboxílicos (por ejemplo, clidanaco, cetorolaco, tinoridina), derivados del ácido arilpropiónico (por ejemplo, alminoprofeno, benoxaprofeno, bermoprofeno, ácido buclórico, carprofeno, fenoprofeno, flunoxaprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, ibuproxam, indoprofeno, cetoprofeno, loxoprofeno, naproxeno, oxaprozina, picetoproleno, piroprofeno, pranoprofeno, ácido proticínico, suprofen, ácido tiaprofénico, ximoprofeno, zaltoprofen), pirazoles (por ejemplo, difenamilol, epirizol), pirazonas (por ejemplo, apazona, benzpiperilona, feprazona, mofebutazona, morazona, oxifenbutazona, fenilbutazona, pipebuzona, propifenazona, ramifenazona, suxibuzona, tiazolinobutazona), derivados del ácido salicílico (por ejemplo,

acetaminosalol, aspirina, benorilato, bromosaligenina, acetilsalicilato de calcio, diflunisal, etersalato, fendosal, ácido gentísico, salicilato de glicol, salicilato de imidazol, acetilsalicilato de lisina, mesalamina, salicilato de morfina, salicilato de 1-naftilo, olsalazina, parsalmida, acetilsalicilato de fenilo, salicilato de fenilo, salacetamida, ácido salicilamida o-acético, ácido salicilsulfúrico, salsalato, sulfasalacina), tiacincarcboxamidas (por ejemplo, ampiroxica, droxica, isoxica, lornoxicam, piroxica, tenoxicam), ácido ϵ -acetamidocaproico, s-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, amixetrina, bendazaco, bencidamina, bucolome, difenpiramida, ditazol, emorfazona, fepradinol, guayazuleno, nabumetona, nimesulida, oxaceprol, paranilina, perisoxal, proquazona, superóxido dismutasa, tenidap y zileutón.

- 10 Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen sin limitación, pirimidinas 2-amino-6-aril-5-sustituidas (véase patente de EE.UU. nº 4.665.077); azatioprina; ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona; glutaraldehído (que enmascara los antígenos MHC, tal como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.120.649); anticuerpos antiidiotípicos para antígenos MHC y fragmentos MHC; ciclosporina A; esteroides tales como glucocorticosteroides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona y dexametasona; citocina o antagonistas de receptores de citocinas que incluyen anticuerpos anti-interferón- γ , - β , o - α , anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral α , anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral 43, anticuerpos de anti-interleucina-2 y anticuerpos de receptor de anti-IL-2; anticuerpos anti-LFA-1, que incluyen anti-CD11a y anticuerpos anti-CD18; anticuerpos anti-L3T4 anticuerpos; anti-linfocito globulina; anticuerpos panT, preferentemente anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3 (documento WO-90/08.187 publicado el 26 de julio de 1990); estreptocinasa; TGF- β ; estreptodornasa; ARN o ADN del hospedador; FK506; RS-61443; deoxispermualina; rapamicina; receptor de linfocitos T (Cohen y col., patente de EE.UU. nº 5.114.721); fragmentos de receptor de linfocitos T (Offner y col., *Science*, 251: 430-432 (1991); documento WO-90/11.294; laneway, *Nature*, 341: 482 (1989); y documento WO-91/01.133); y anticuerpos de receptores de linfocitos T (documento EP-340.109) tales como T10139; anticuerpos anti-CD19 tal como se describe en Hekman y col. *Cancer Immunol. Immunother.* 32:364-372 (1991) y Vlasveld y col. *Cancer Immunol. Immunother.* 40:37-47 (1995); el anticuerpo B4 en Kiesel y col. *Leukemia Research* II, 12: 1119 (1987); anticuerpos anti-CD22 que incluyen epratuzmab; anticuerpos anti-BlyS(CD257) que incluyen Belimumab (benalysta); anticuerpos anti-CD20 que incluyen ocrelizumab, rituximab y ofatumumab. "Rituximab" o "RITUXAN®" se refiere al anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico diseñado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20 y designado como "C2B8" en la patente de EE.UU. nº 5.736.137. El anticuerpo es una inmunoglobulina IgG₁ kappa que contiene secuencias de regiones variables de cadena ligera y pesada murinas y secuencias de regiones constantes humanas. Rituximab tiene una afinidad de unión para el antígeno CD20 de aproximadamente 8,0 nM.

Los ejemplos de agentes antivíricos incluyen interferón gamma, zidovudina, clorhidrato de amantadina, ribavirina, aciclovir, valciclovir, didesoxicitidina, ácido fosfonofórmico, ganciclovir y derivados de los mismos.

- 35 Los ejemplos de agentes que inhiben los linfocitos B, bloquean la diferenciación de linfocitos B o la activación de linfocitos B de memoria incluyen anticuerpos anti-CD19, anticuerpos anti-CD22 que incluyen epratuzmab; anticuerpos anti-BlyS (CD257) que incluyen Belimumab (benalysta); anticuerpos anti-CD20 que incluyen ocrelizumab, rituximab, ofatumumab y "Rituximab" o "RITUXAN®".

- 40 Los ejemplos de agentes antioxidantes incluyen ascorbato, alfa-tocoferol, manitol, glutatión reducido, diversos carotenoides, cisteína, ácido úrico, taurina, tirosina, superóxido dismutasa, luteína, zeaxantina, criotpxantina, astaxantina, licopeno, N-acetil-cisteína, carnosina, gamma-glutamylcisteína, quercitina, lactoferrina, ácido dihidrolipoico, citrato, extracto de Ginkgo biloba, catequinas del té, extracto de arándano, vitaminas E o ésteres de vitamina E, palmitato de retinilo, y derivados de los mismos. Otros agentes terapéuticos incluyen escualamina, inhibidores de anhidrasa carbónica, agonistas de receptores alfa-2 adrenérgicos, antiparasitarios, antifúngicos y derivados de los mismos.

- 50 Preferentemente, el polipéptido de HRS puede administrarse en una dosificación diaria fija, y los otros agentes activos se toman según se necesite. Cuando el polipéptido de HRS se administra como terapia adyuvante con un segundo agente activo, una dosificación diaria preferida es de aproximadamente 0,1 mg/kg/24 horas a aproximadamente 55 mg/kg/24 horas, de más preferentemente aproximadamente 2 mg/kg/24 horas a aproximadamente 20 mg/kg/24 horas.

- 55 La dosis exacta de cada componente administrado diferirá, naturalmente, dependiendo de los componentes específicos prescritos, del sujeto tratado, de la gravedad de la enfermedad, por ejemplo, la gravedad de la reacción inflamatoria, de la forma de administración y del criterio del médico. Así, debido a la variabilidad entre pacientes, las dosificaciones suministradas anteriormente sirven de guía y el médico puede ajustar las dosis de los compuestos para conseguir el tratamiento que el médico considere apropiado.

- 60 **Kits**

Las realizaciones de la presente descripción, en otros aspectos, proporcionan kits que comprenden uno o más recipientes llenos con uno o más de los polipéptidos de HRS, polinucleótidos, anticuerpos y proteínas de unión aislados tal como se describe en la presente memoria. Los kits pueden incluir instrucciones por escrito sobre cómo usar dichas composiciones (por ejemplo, para señalización celular modular, condiciones inflamatorias, diagnóstico, etc.).

Los kits en la presente memoria pueden incluir también uno o más agentes terapéuticos adicionales u otros componentes adecuados o deseados para la indicación que se trata, o para la aplicación diagnóstica deseada. Un agente terapéutico adicional puede estar contenido en un segundo recipiente, si se desea. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales incluyen, pero no se limitan a agentes antineoplásicos, agentes antiinflamatorios, agentes antibacterianos, agentes antivíricos, agentes angiogénicos, etc.

Los kits en la presente memoria pueden incluir también una o más jeringas u otros componentes necesarios o deseados para facilitar un modo de suministro pretendido (por ejemplo, endoprótesis, depots implantables, etc.).

En otro aspecto de la presente descripción, los kits comprenden: a) un recipiente que comprende un componente de polipéptido de HRS; y b) instrucciones de uso. Las instrucciones pueden incluir etapas sobre cómo manejar los polipéptidos de HRS, cómo almacenar los polipéptidos de HRS y qué esperar del uso de los polipéptidos de HRS.

En otro aspecto de la presente descripción, los kits comprenden: a) un recipiente que comprende un vector o polinucleótido recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un componente de polipéptido de HRS; y b) instrucciones de uso. Las instrucciones pueden incluir etapas sobre cómo manejar los vectores o polinucleótidos, cómo almacenar los vectores o polinucleótidos o cómo transfectar células con los vectores o polinucleótidos.

En otro aspecto de la presente descripción, se proporcionan kits para tratar una enfermedad o trastorno que comprenden: a) un recipiente que comprende una composición farmacéutica que comprende un componente de polipéptido de HRS en una formulación farmacéuticamente aceptable y b) instrucciones, y/o un inserto de producto.

30 **Diagnóstico**

Los polipéptidos de HRS, y los polinucleótidos correspondientes (polinucleótidos de HRS), pueden usarse en ensayos de diagnóstico y composiciones diagnósticas. Se incluyen procedimientos y composiciones bioquímicos, histológicos y basados en células, entre otros.

Estas y otras realizaciones relacionadas de la presente descripción incluyen la detección de la o las secuencias de polinucleótidos de HRS o la o las secuencias de polipéptidos de HRS correspondientes o partes de las mismas, o anticuerpos de las mismas. Por ejemplo, algunos aspectos de la presente descripción incluyen detección de la o las secuencias de polinucleótidos de HRS o la o las secuencias de polipéptidos correspondientes o partes de las mismas de una o más variantes de splicing de HRS recién identificadas, y/o una o más uniones de splicing de esas variantes de splicing. En algunas realizaciones de la presente descripción, la o las secuencias de polinucleótidos o polipéptidos correspondientes de al menos una de las uniones de splicing es única para esa variante de splicing de HRS en particular. En algunas realizaciones de la presente descripción dichas variantes de splicing de HRS pueden indicar una susceptibilidad a una enfermedad, que incluye por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, enfermedad(es) inflamatoria(s), distrofias musculares, rabdomiólisis, caquexia y otras enfermedades descritas en la presente memoria.

Se incluye también la detección directa de fragmentos de proteínas de HRS, que incluyen variantes de splicing, fragmentos proteolíticos, y otros. En algunas realizaciones de la presente descripción, la presencia o los niveles de uno o más fragmentos de proteínas de HRS recién identificados se asocian o están correlacionados con uno o más tipos celulares o estados celulares, que incluyen por ejemplo autoanticuerpos específicos. Por ello, la presencia o los niveles de un polipéptido o polinucleótido de HRS pueden usarse para distinguir entre diferentes tipos celulares o diferentes estados celulares. La presencia o los niveles de fragmentos de proteínas de HRS o sus polinucleótidos relacionados pueden detectarse de acuerdo con técnicas diagnósticas basadas en polinucleótidos y/o polipéptidos, tal como se describe en la presente memoria y se conoce en la técnica.

Algunos aspectos de la presente descripción pueden emplear los fragmentos de proteínas de HRS, o polinucleótidos de HRS como parte de un procedimiento diagnóstico acompañante, normalmente para evaluar si un sujeto o una población de sujetos responderán favorablemente un tratamiento médico específico. Por ejemplo, un agente terapéutico basado en un polipéptido de HRS dado (por ejemplo, fragmento de proteína, anticuerpo, agente de unión) podría identificarse como adecuado para un sujeto o ciertas poblaciones de sujetos basándose en si el o los

sujetos tienen uno o más biomarcadores seleccionados, o anticuerpos para una enfermedad o afección dada. Los ejemplos de biomarcadores incluyen marcadores de suero/tejido, anticuerpos preexistentes para histidil-tRNA sintetasa, así como marcadores que pueden identificarse por técnicas de imagen médicas. En algunas realizaciones de la presente descripción, una proteína de HRS de origen natural, o un fragmento de la misma (o su polinucleótido correspondiente) puede proporcionar en sí misma un biomarcador de suero y/o tejido que puede usarse para medir los niveles de anti-polipéptidos de HRS, o los niveles de polipéptido de HRS libres en un sujeto específico o una población de sujetos específica. En algunos aspectos de la presente descripción, la identificación de un polipéptido de HRS o una secuencia de referencia de polinucleótido puede incluir la caracterización de la expresión diferencial de esa secuencia, ya sea en un sujeto seleccionado, un tejido seleccionado, u otros, tal como se describe en la presente memoria y se conoce en la técnica.

Algunos de los procedimientos proporcionados en la presente memoria se basan en la expresión diferencial de un polipéptido o polinucleótido de HRS para caracterizar la condición o estado de una célula, tejido o sujeto, y para distinguirlo de otra célula, tejido o sujeto. Los ejemplos no limitativos incluyen procedimientos de detección de la presencia o los niveles de un polipéptido o polinucleótido de HRS en una muestra biológica para distinguir entre células o tejidos de diferente especies, células de diferentes tejidos u órganos, estados de desarrollo celular tales como neonatal y adulto, estados de diferenciación celular, condiciones tales como sano, enfermo y tratado, fracciones intracelulares y extracelulares, además de cultivos celulares primarios y otros cultivos celulares, tales como cultivos celulares inmortalizados.

La expresión diferencial incluye una diferencia estadísticamente significativa en uno o más niveles de expresión génica de una secuencia de referencia de polinucleótidos o polipéptidos de HRS en comparación con los niveles de expresión de la misma secuencia en un control apropiado. La diferencia estadísticamente significativa puede referirse a un aumento o una disminución en los niveles de expresión, tal como se mide por niveles de ARN, niveles de proteínas, función de proteínas, o cualquier otra medida relevante de la expresión génica tales como los descritos en la presente memoria. Se incluye también una comparación entre un polinucleótido o polipéptido de HRS de la presente descripción y una secuencia de HRS citosólica o mitocondrial de longitud completa o tipo no mutado, normalmente del mismo tipo u otro correspondiente. La expresión diferencial puede detectarse mediante diversas técnicas en la técnica y se describe en la presente memoria, que incluye técnicas basadas en polinucleótidos y polipéptidos, tales como PCR en tiempo real, hibridación sustractiva, matrices de polinucleótidos y polipéptidos, y otros.

Un resultado se refiere normalmente como estadísticamente significativo si es poco probable que se haya producido por azar. El nivel de significación de una prueba o resultado se refiere tradicionalmente a un concepto de prueba de hipótesis estadística frecuentista. En casos sencillos, la significación estadística puede definirse como la probabilidad de tomar una decisión para rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es en realidad cierta (una decisión conocida como error de Tipo I, o "determinación de falso positivo"). Esta decisión se toma a menudo mediante el uso del valor p: si el valor p es inferior al nivel de significación, entonces la hipótesis nula se rechaza. Cuanto menor es el valor p, más significativo es el resultado. También pueden usarse los factores de Bayes para determinar la significación estadística (véase, por ejemplo, Goodman S., *Ann Intern Med* 130:1005-13, 1999).

En casos más complicados, pero en la práctica más importantes, el nivel de significación de una prueba o resultado puede reflejar un análisis en el que la probabilidad de tomar una decisión para rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es en realidad cierta no es superior a la probabilidad establecida. Este tipo de análisis facilita aquellas aplicaciones en las que la probabilidad de tomar la decisión del rechazo puede ser mucho menor que el nivel de significación para algunos conjuntos de suposiciones comprendidos dentro de la hipótesis nula.

En algunas realizaciones de ejemplo de la presente descripción, la expresión diferencial estadísticamente significativa puede incluir situaciones donde el nivel de expresión de una secuencia de HRS dada proporciona al menos aproximadamente una diferencia de expresión 1,2X, 1,3X, 1,4X, 1,5X, 1,6X, 1,7X, 1,8X, 1,9X, 2,0X, 2,2X, 2,4X, 2,6X, 2,8X, 3,0X, 4,0X, 5,0X, 6,0X, 7,0X, 8,0X, 9,0X, 10,0X, 15,0X, 20,0X, 50,0X, 100,0X, o superior (es decir, una expresión diferencial que puede ser una expresión mayor o menor) en una muestra biológica sospechosa en comparación con un control apropiado, lo que incluye todos los números enteros y decimales intermedios (por ejemplo, 1,24X, 1,25X, 2,1X, 2,5X, 60,0X, 75,0X, etc.). En algunas realizaciones de la presente descripción, la expresión diferencial estadísticamente significativa puede incluir situaciones donde el nivel de expresión de una secuencia de HRS dada proporciona una diferencia de al menos aproximadamente el 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000% (%) o más en la expresión (es decir, expresión diferencial que puede ser mayor o menor) en una muestra biológica sospechosa en comparación con un control apropiado, que incluye todos los números enteros y decimales intermedios.

Como ejemplo adicional, la expresión diferencial puede determinarse también realizando la prueba Z, es decir, calculando una puntuación Z absoluta, tal como se describe en la presente memoria y se conoce en la técnica. La prueba Z se usa normalmente para identificar diferencias significativas entre una media de muestra y una media de población. Por ejemplo, en comparación con una tabla normal estándar (por ejemplo, un tejido de control), en un intervalo de confianza del 95% (es decir, en el nivel de significación del 5%), una puntuación Z con un valor absoluto mayor que 1,96 indica no aleatoriedad. Para un intervalo de confianza del 99%, si el Z absoluto es superior a 2,58, significa que $p < 0,01$, y la diferencia es todavía más significativa, la hipótesis nula puede rechazarse con mayor confianza. En estas y otras realizaciones relacionadas de la presente descripción, una puntuación Z absoluta de 1,96, 2, 2,58, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más, que incluye todos los decimales intermedios (por ejemplo, 10,1, 10,6, 11,2, etc.), puede proporcionar una fuerte medida de significación estadística. En algunas realizaciones de la presente descripción, una puntuación Z absoluta de más de 6 puede proporcionar una significación estadística excepcionalmente alta.

Análogamente sustancial se refiere en general a la falta de una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión entre la muestra biológica y el control de referencia. Los ejemplos de niveles de expresión sustancialmente similares pueden incluir situaciones donde el nivel de expresión de un SSCIGS dado proporciona menos de aproximadamente 0,05X, 0,1X, 0,2X, 0,3X, 0,4X, 0,5X, 0,6X, 0,7X, 0,8X, 0,9X, 1,0X, 1,1X, 1,2X, 1,3X o 1,4X de diferencia en la expresión (es decir, expresión diferencial que puede ser una expresión mayor o menor) en una muestra biológica sospechosa en comparación con una muestra de referencia, que incluye todos los decimales intermedios (por ejemplo, 15X, 0,25X, 0,35X, etc.). En algunas realizaciones de la presente descripción, la expresión diferencial puede incluir situaciones donde el nivel de expresión de una secuencia de HRS dada proporciona menos de aproximadamente el 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50% (%) de diferencia en expresión (es decir, expresión diferencial que puede ser mayor o menor) en una muestra biológica sospechosa en comparación con una muestra de referencia, que incluye todos los decimales intermedios.

En algunas realizaciones de la presente descripción, tales como cuando se usa Affymetrix Microarray para medir los niveles de expresión de una secuencia de referencia de polinucleótidos o polipéptidos de HRS, la expresión diferencial puede determinarse también por el valor medio de expresión resumido por el software Affymetrix Microarray Suite 5 (Affymetrix, Santa Clara, CA), u otro software similar, normalmente con un valor de expresión medio de escala de 1.000.

Las realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos para detectar la presencia o los niveles de una secuencia de referencia de polinucleótidos o polipéptidos de HRS para caracterizar o diagnosticar la condición o una célula, tejido, órgano o sujeto, en que esa condición puede caracterizarse como sana, enferma, en riesgo de enfermar o tratada. Para dichos fines de diagnóstico, el término "diagnóstico" o "diagnosticado" incluye la identificación de la presencia o la naturaleza de un estado patológico, la caracterización del riesgo de desarrollar dicha condición y/o la medida del cambio (o ausencia de cambio) de un estado patológico en respuesta a la terapia. Los procedimientos diagnósticos pueden diferir en su sensibilidad y especificidad. En algunas realizaciones de la presente descripción, la "sensibilidad" de un ensayo diagnóstico se refiere al porcentaje de células, tejidos o sujetos enfermos con prueba positiva (porcentaje de "positivos verdaderos"). Las células, tejidos o sujetos enfermos no detectados por el ensayo se refieren normalmente como "falsos negativos". Las células, tejidos o sujetos que no están enfermos y que son negativos en el ensayo pueden denominarse "negativos verdaderos". En algunas realizaciones de la presente descripción, la "especificidad" de un ensayo diagnóstico puede definirse como uno (1) menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de "falsos positivos" se define como la proporción de las muestras o sujetos sin la enfermedad y que dan resultado positivo. Aunque un procedimiento diagnóstico en particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, basta con que el procedimiento proporcione una indicación positiva que ayuda en el diagnóstico.

En algunos casos, la presencia o el riesgo de desarrollar un estado patológico puede diagnosticarse comparando la presencia o los niveles de uno o más secuencias de referencia de polinucleótidos o polipéptidos de HRS seleccionadas o partes de las mismas, o anticuerpos de las mismas, que están correlacionadas con la afección, ya sea con niveles aumentados o disminuidos, en comparación con un control adecuado. Un "control adecuado" o "control apropiado" incluye un valor, nivel, rasgo, característica o propiedad determinados en una célula u otra muestra biológica de un tejido u organismo, por ejemplo, un control o célula, tejido u organismo normal, que muestra, por ejemplo, rasgos normales, tales como la ausencia de la afección. En algunas realizaciones de la presente descripción, un "control adecuado" o "control apropiado" es un valor, nivel, rasgo, característica o propiedad predefinidos. Otros controles adecuados serán evidentes para los expertos en la materia. Los ejemplos de enfermedades y afecciones, por ejemplo, enfermedades asociadas con autoanticuerpos específicos para histidil-tRNA sintetasa, se describen en otra parte de la presente memoria.

Las realizaciones de la presente descripción incluyen técnicas de detección basadas en ácidos nucleicos o

polinucleótido de HRS, que ofrecen ciertas ventajas debido a la sensibilidad de detección. Por ello, algunas realizaciones de la presente descripción se refieren al uso o detección de polinucleótidos de HRS como parte de un procedimiento o ensayo diagnóstico. La presencia y/o niveles de polinucleótidos de HRS puede medirse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, que incluye ensayos de hibridación tales como Northern blot, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o cualitativa, PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) cuantitativa o cualitativa, micromatriz, dot o slot blots o hibridación *in situ* tal como hibridación *in situ* fluorescente (FISH), entre otros. Algunos de estos procedimientos se describen en mayor detalle más adelante.

Los polinucleótidos de HRS tales como ADN y ARN pueden recogerse y/o generarse a partir de sangre, fluidos biológicos, tejidos, órganos, líneas celulares u otra muestra relevante usando técnicas conocidas en la técnica, tales como las descritas en Kingston. (2002 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (véase, por ejemplo, tal como se describe por Nelson y col. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 11890-11895, 2002)) y otras fuentes. Además, existen diversos kits disponibles comercialmente para construir ARN útiles en la preparación de ARN que se usarán en la presente descripción. El ARN puede construirse a partir de órganos/tejidos/células procurados por sujetos sanos normales; sin embargo, esta descripción contempla también la construcción de ARN a partir de sujetos enfermos. Algunas realizaciones de la presente descripción contemplan el uso de cualquier tipo de órgano procedente de cualquier tipo de sujeto o animal. Para la prueba puede procurarse ARN de muestra de un individuo (por ejemplo, cualquier animal, incluyendo los mamíferos) con o sin enfermedad visible y a partir de muestras de tejido, fluidos biológicos (por ejemplo, sangre entera) o similares.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la amplificación o construcción de secuencias de ADNc puede servir de ayuda para aumentar las capacidades de detección. La presente descripción, así como la técnica, proporciona el nivel requerido de detalle para realizar dichas tareas. En una realización de ejemplo de la presente descripción, la sangre entera se usa como fuente de ARN y por consiguiente, se usan opcionalmente reactivos de estabilización de ARN, tales como tubos PAX, como se describe, por ejemplo, en Thach y col., *J. Immunol. Methods*. Dic 283(1-2):269-279, 2003 y Chai y col., *J. Clin. Lab Anal.* 19(5):182-188, 2005. Las bibliotecas de ADN complementario (ADNc) pueden generarse usando técnicas conocidas en la técnica, tales como las descritas en Ausubel y col. (2001 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Sambrook y col. (1989 *Molecular Cloning*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis y col. (1982 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY) y otras fuentes. Además, diversos kits disponibles comercialmente para construir bibliotecas de ADNc son útiles para preparar las bibliotecas de ADNc de la presente descripción. Las bibliotecas pueden construirse a partir de órganos/tejidos/células procurados por sujetos sanos normales.

Algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear procedimientos de hibridación para detectar secuencias de polinucleótidos de HRS. En la técnica se han desarrollado bien procedimientos para realizar ensayos de hibridación de polinucleótidos. Los procedimientos y condiciones de los ensayos de hibridación variarán dependiendo de la aplicación y se seleccionan de acuerdo con los procedimientos de unión generales conocidos que incluyen los referidos en: Maniatis y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); Berger y Kimmel *Methods in Enzymology*, Vol. 152, *Guide to Molecular Cloning Techniques* (Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987); Young y Davis, *PNAS*. 80: 1194 (1983). Los procedimientos y aparatos para realizar reacciones de hibridación reacciones repetidas y controladas se han descrito en las patentes de EE.UU. nº 5.871.928, 5.874.219, 6.045.996 y 6.386.749, 6.391.623.

Algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos para detectar secuencias de polinucleótidos de HRS. El término "amplificación" o "amplificación de ácidos nucleicos" se refiere a la producción de múltiples copias de un ácido nucleico diana que contiene al menos una parte de la secuencia diana específica de ácidos nucleicos. Las múltiples copias pueden referirse como amplicones o productos de amplificación. En algunas realizaciones de la presente descripción, la diana amplificada contiene menos de la secuencia completa de genes diana (intrones y exones) o una secuencia de genes diana expresada (transcripción de splicing de exones y secuencias de flanqueo no traducidas). Por ejemplo, pueden producirse amplicones específicos amplificando una parte del polinucleótido diana mediante el uso de cebadores de amplificación que se hibridan en, e inician la polimerización a partir de, posiciones internas del polinucleótido diana. Preferentemente, la parte amplificada contiene una secuencia diana detectable que puede detectarse usando cualquiera de una diversidad de procedimientos bien conocidos.

La "amplificación selectiva" o "amplificación específica", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la amplificación de una secuencia diana de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente descripción donde la amplificación detectable de la secuencia diana está limitada sustancialmente a una amplificación de secuencia diana a la que contribuye una muestra de interés de ácidos nucleicos que se somete a ensayo y a la que no contribuye una secuencia diana de ácidos nucleicos a la que contribuyen algunas otras fuentes de muestra, por ejemplo, la

contaminación presente en los reactivos usados durante reacciones de amplificación o en el entorno en el que se realizan las reacciones de amplificación.

El término "condiciones de amplificación" se refiere a condiciones que permiten la amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente descripción. En algunas realizaciones de la presente descripción, las condiciones de amplificación pueden ser menos astringentes que las "condiciones de hibridación astringentes" tal como se describe en la presente memoria. Los oligonucleótidos usados en las reacciones de amplificación de la presente descripción se hibridan en sus dianas pretendidas en condiciones de amplificación, pero pueden hibridarse o no en condiciones de hibridación astringentes. Por otra parte, las sondas de detección de la presente descripción normalmente se hibridan en condiciones de hibridación astringentes. Las condiciones aceptables para realizar amplificaciones de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente descripción pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la materia dependiendo del procedimiento de amplificación empleado en particular.

Muchos procedimientos bien conocidos de amplificación de ácidos nucleicos requieren termociclado para desnaturalizar alternativamente ácidos nucleicos bicatenarios e hibridar cebadores; sin embargo, otros procedimientos bien conocidos de amplificación de ácidos nucleicos son isotérmicos. La reacción en cadena de la polimerasa (patentes de EE.UU. nº 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; 4.965.188), referida comúnmente como PCR, usa múltiples ciclos de desnaturalización, apareamiento de pares de cebadores con cadenas opuestas y extensión de cebadores para aumentar exponencialmente los números de copia de la secuencia diana. En una variación denominada RT-PCR, se usa transcriptasa inversa (RT) para preparar un ADN complementario (ADNc) a partir de ARNm, y a continuación se amplifica el ADNc por PCR para producir múltiples copias de ADN.

Tal como se indica anteriormente, el término "PCR" se refiere a múltiples ciclos de amplificación que amplifican selectivamente una especie de ácido nucleico diana. Se incluyen PCR cuantitativa (qPCR), PCR en tiempo real, PCR de transcripción inversa (RT-PCR) y PCR de transcripción inversa cualitativa (qRT-PCR) que están bien descritas en la técnica. El término "pPCR" se refiere a una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, y el término "qRT-PCR" se refiere a una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa. qPCR y qRT-PCR pueden usarse para amplificar y simultáneamente cuantificar una molécula de ADNc diana. Permite la detección y la cuantificación de una secuencia específica en una reserva de ADNc, tal como un gen AARS o transcripción seleccionados.

El término "PCR en tiempo real" puede usar un colorante de unión a ADN para unirse a ADN bicatenario (bc) en PCR, lo que provoca la fluorescencia del colorante. Por tanto, un aumento en el producto de ADN durante la PCR conduce a un aumento en la intensidad de la fluorescencia y se mide en cada ciclo, permitiendo así cuantificar las concentraciones de ADN. Sin embargo, los colorantes de ADNbc tales como SYBR Green se unirán a todos los productos de PCR de ADNbc. La fluorescencia se detecta y se mide en el termociclador de la PCR en tiempo real, y su aumento geométrico correspondiente al incremento exponencial del producto se usa para determinar el ciclo umbral ("Ct") en cada reacción.

El término "puntuación Ct" se refiere al número de ciclo umbral, que es el ciclo para el cual la amplificación de PCR ha superado un nivel umbral. Si existe una mayor cantidad de ARNm para un gen en particular en una muestra, atravesará el umbral antes que un gen de expresión baja dado que existe más ARN de partida para amplificar. Por tanto, una puntuación Ct baja indica una alta expresión génica en una muestra y una puntuación Ct alta es indicativa de baja expresión génica.

Algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear la reacción en cadena de la ligasa (Weiss, *Science*, 254: 1292, 1991), referida comúnmente como LCR, que usa dos conjuntos de oligonucleótidos de ADN complementario que se hibridan en regiones adyacentes del ácido nucleico diana. Los oligonucleótidos de ADN están unidos por medios covalentes por una ADN ligasa en ciclos repetidos de desnaturalización térmica, hibridación y ligación para producir un producto de oligonucleótido ligado bicatenario detectable.

Otro procedimiento es la amplificación de desplazamiento de cadena (Walker y col., 1992, *PNAS USA* 89:392-396; patentes de EE.UU. nº 5.270.184 y 5.455.166), referido comúnmente como SDA, que usa ciclos de pares de apareamiento de secuencias de cebador en secuencias opuestas de una secuencia diana, extensión de cebador en presencia de un dNTPαS para producir un producto de extensión de cebador hemifosforotado doble, marca con incisión mediada por endonucleasas de un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción hemimodificado y una extensión de cebador mediada por polimerasa desde el extremo 3' de la incisión para desplazar una cadena existente y producir una cadena para la siguiente tanda de apareamiento de cebador, marca con incisión y desplazamiento de cadena, para producir la amplificación geométrica del producto. La SDA termófila (tSDA) usa endonucleasas y polimerasas termófilas a altas temperaturas esencialmente en el mismo procedimiento (patente europea nº 0.684.315).

Otros procedimientos de amplificación incluyen, por ejemplo: amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (patente de EE.UU. nº 5.130.238), referida comúnmente como NASBA; una que usa una ARN replicasa para amplificar la molécula de sonda en sí misma (Lizardi y col., 1988, *BioTechnol.* 6: 1197-1202), referida
 5 comúnmente como Q β replicasa; un procedimiento de amplificación basado en transcripción (Kwoh, D. y col., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177); una replicación de secuencias autosostenida (Guatelli, J. y col., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-1878); y una amplificación mediada por transcripción (patentes de EE.UU. nº 5.480.784 y 5.399.491), referida comúnmente como TMA. Para una exposición más en detalle de procedimientos de amplificación conocidos, véase Persing, David H., 1993, "In vitro Nucleic Acid Amplification Techniques" en
 10 *Diagnostic Medical Microbiology: Principles and Applications* (Persing y col., ed.), pág. 51-87 (American Society for Microbiology, Washington, DC).

Los sistemas de amplificación basados en transcripción ilustrativos de la presente descripción incluyen TMA, que emplea una ARN polimerasa para producir múltiples transcripciones de ARN de una región diana (patentes de
 15 EE.UU. nº 5.480.784 y 5.399.491). La TMA usa un "promotor-cebador" que se hibrida en un ácido nucleico diana en presencia de una transcriptasa inversa y una ARN polimerasa para formar un promotor bicatenario a partir del cual la ARN polimerasa produce transcripciones de ARN. Estas transcripciones pueden convertirse en plantillas para tandas adicionales de TMA en presencia de un segundo cebador capaz de hibridarse con las transcripciones de ARN. A diferencia de la PCR, la LCR u otros procedimientos que requieren desnaturalización por calor, la TMA es un
 20 procedimiento isotérmico que usa actividad de RNasa H para digerir la cadena de ARN de un híbrido ARN:ADN, haciendo así que la cadena de ADN esté disponible para hibridación con un cebador o un promotor-cebador. En general se usa la actividad de RNasa H asociada con la transcriptasa inversa proporcionada para amplificación.

En un procedimiento de TMA ilustrativo, un cebador de amplificación es un promotor-cebador de oligonucleótido que
 25 comprende una secuencia de promotor que se vuelve funcional cuando es bicatenaria, situada en posición 5' de una secuencia de unión a diana, que es capaz de hibridarse con un sitio de unión de un ARN diana en una posición 3' en la secuencia que se amplificará. Un promotor-cebador puede referirse como "cebador T7" cuando es específico para el reconocimiento de T7 ARN polimerasa. En ciertas circunstancias, el extremo 3' de un promotor-cebador, o una subpoblación de dichos promotores-cebadores, puede modificarse para bloquear o reducir la extensión del cebador.
 30 A partir de un promotor-cebador no modificado, la transcriptasa inversa crea una copia de ADNc del ARN diana, mientras que la actividad de RNasa H degrada el ARN diana. A continuación un segundo cebador de amplificación se une al ADNc. Este cebador puede referirse como "cebador no T7" para distinguirlo de un "cebador T7". A partir de este segundo cebador de amplificación, la transcriptasa inversa crea otra cadena de ADN, lo que produce un ADN bicatenario con un promotor funcional en un extremo. Cuando es bicatenaria, la secuencia de promotor es capaz de
 35 unirse a una ARN polimerasa para iniciar la transcripción de la secuencia diana con la que se hibrida el promotor-cebador. Una ARN polimerasa usa esta secuencia de promotor para producir múltiples transcripciones de ARN (es decir, amplicones), en general de aproximadamente 100 a 1.000 copias. Cada amplicón recién sintetizado puede hibridarse con el segundo cebador de amplificación. A continuación la transcriptasa inversa puede crear una copia de ADN, mientras que la actividad de RNasa H degrada el ARN de este dúplex ARN:ADN. El promotor-cebador
 40 puede unirse a continuación con el ADN recién sintetizado, permitiendo que la transcriptasa inversa creea un ADN bicatenario, a partir del cual la ARN polimerasa produce múltiples amplicones. Así, puede conseguirse una amplificación mil millones de veces isotérmica usando dos cebadores de amplificación.

En algunas realizaciones de la presente descripción, pueden usarse otras técnicas para evaluar las transcripciones
 45 de ARN de las transcripciones a partir de una biblioteca de ADNc en particular, que incluye análisis de micromatriz (Han y col., *Nat Biotechnol.* 19: 631-635, 2001; Bao y col., *Anal Chem.* 74: 1792-1797, 2002; Schena y col., *PNAS. USA* 93:10614-19, 1996; y Heller y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2150-55, 1997) y SAGE (análisis en serie de la expresión génica). Al igual que MPSS, SAGE es digital y puede generar un gran número de secuencias de
 50 *Bioessays.* 2004 Aug; 26(8):916-22), aunque en órdenes de magnitud inferiores a los disponibles en técnicas tales como MPSS.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el término "micromatriz" incluye una "micromatriz de ácidos nucleicos" que tienen una pluralidad de ácidos nucleicos unidos a sustrato, siendo la hibridación a cada uno de la
 55 pluralidad de ácidos nucleicos unidos detectable por separado. El sustrato puede ser sólido o poroso, plano o no plano, unitario o distribuido. Las micromatrices de ácidos nucleicos incluyen todos los dispositivos así denominados en Schena (ed.), *ADN Microarrays: A Practical Approach* (Practical Approach Series), Oxford University Press (1999); *Nature Genet.* 21(1) (supl.): 1-60 (1999); Schena (ed.), *Microarray Biochip: Tools and Technology*, Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000). Las micromatrices de ácidos nucleicos pueden incluir
 60 una pluralidad de ácidos nucleicos unidos a sustrato en las que la pluralidad de ácidos nucleicos se dispone en una pluralidad de perlas, más que sobre un sustrato plano unitario, tal como se describe, por ejemplo, en Brenner y col.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4): 1665-1670 (2000). Pueden encontrarse ejemplos de micromatrices de ácidos nucleicos en las patentes de EE.UU. nº 6.391.623, 6.383.754, 6.383.749, 6.380.377, 6.379.897, 6.376.191, 6.372.431, 6.351.712, 6.344.316, 6.316.193, 6.312.906, 6.309.828, 6.309.824, 6.306.643, 6.300.063, 6.287.850, 6.284.497, 6.284.465, 6.280.954, 6.262.216, 6.251.601, 6.245.518, 6.263.287, 6.251.601, 6.238.866, 6.228.575, 6.214.587, 6.203.989, 6.171.797, 6.103.474, 6.083.726, 6.054.274, 6.040.138, 6.083.726, 6.004.755, 6.001.309, 5.958.342, 5.952.180, 5.936.731, 5.843.655, 5.814.454, 5.837.196, 5.436.327, 5.412.087 y 5.405.783.

Los ejemplos adicionales incluyen matrices de ácidos nucleicos que están disponibles comercialmente en Affymetrix (Santa Clara, Calif.) con el nombre de GENECHIP™. Se proporcionan procedimientos de ejemplo adicionales de fabricación y uso de matrices, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 7.028.629; 7.011.949; 7.011.945; 6.936.419; 6.927.032; 6.924.103; 6.921.642 y 6.818.394.

La presente descripción en lo que se refiere a matrices y micromatrices también contempla numerosos usos de los polímeros adjuntos a sustratos sólidos. Estos usos incluyen seguimiento y perfiles de la expresión génica, cribado de bibliotecas, genotipado y diagnóstico. Los procedimientos de seguimiento y perfiles de expresión génica y los procedimientos útiles para seguimiento y perfiles de la expresión génica se muestran en las patentes de EE.UU. nº 5.800.992, 6.013.449, 6.020.135, 6.033.860, 6.040.138, 6.177.248 y 6.309.822. El genotipado y los usos se muestran por tanto en las patentes de EE.UU. nº serie 10/442.021, 10/013.598 (solicitud de EE.UU. nº 2003/0.036.069), y las patentes de EE.UU. nº 5.925.525, 6.268.141, 5.856.092, 6.267.152, 6.300.063, 6.525.185, 6.632.611, 5.858.659, 6.284.460, 6.361.947, 6.368.799, 6.673.579 y 6.333.179. Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos, etiquetado y análisis que pueden usarse en combinación con los procedimientos descritos en la presente memoria están comprendidos en las patentes de EE.UU. nº 5.871.928, 5.902.723, 6.045.996, 5.541.061 y 6.197.506.

Como será evidente para los expertos en la materia, algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear oligonucleótidos, tales como cebadores o sondas, para la amplificación o detección, tal como se describe en la presente memoria. Los oligonucleótidos de una secuencia y estructura química definidas pueden producirse por técnicas conocidas para los expertos en la materia, tales como síntesis química o bioquímica, y por expresión *in vitro* o *in vivo* de moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, por ejemplo, vectores bacterianos o víricos. En algunas realizaciones de la presente descripción, un oligonucleótido no consiste exclusivamente en ADN cromosómico de tipo no mutado o en los productos de transcripción *in vivo* del mismo.

Los oligonucleótidos o cebadores pueden modificarse de cualquier forma, siempre que una modificación dada sea compatible con la función deseada de un oligonucleótido dado. Un experto en la materia puede determinar fácilmente si una modificación dada es adecuada o deseable para cualquier oligonucleótido dado de la presente descripción. Los oligonucleótidos AARS relevantes se describen en mayor detalle en otra parte de la presente memoria.

Si bien el diseño y la secuencia de oligonucleótidos depende de su función tal como se describe en la presente memoria, en general se tienen en cuenta varias variables. Entre las más relevantes están: longitud, temperatura de fusión (T_f), especificidad, complementariedad con otros oligonucleótidos en el sistema, contenido G/C, extensiones de polipirimidina (T, C) o polipurina (A, G), y la secuencia en el extremo 3'. El control de estas y otras variables es un aspecto estándar y bien conocido del diseño de oligonucleótidos, y existen varios programas informáticos disponibles para cribar grandes números de oligonucleótidos potenciales como óptimos.

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen por tanto procedimientos para detectar un polinucleótido AARS diana en una muestra, comprendiendo el polinucleótido la secuencia de un polinucleótido AARS de referencia, tal como se describe en la presente memoria, que comprende a) la hibridación de la muestra con una sonda que comprende una secuencia complementaria al polinucleótido diana en la muestra, y esa sonda se hibrida específicamente con dicho polinucleótido diana, en condiciones en que se forma un complejo de hibridación entre dicha sonda y dicho polinucleótido diana o fragmentos del mismo, y b) la detección de la presencia o ausencia de dicho complejo de hibridación, y opcionalmente, si está presente, la cantidad del mismo. Se incluyen también procedimientos para detectar un polinucleótido de HRS diana en una muestra, comprendiendo el polinucleótido la secuencia de un polinucleótido de HRS de referencia, tal como se describe en la presente memoria, que comprende a) la amplificación del polinucleótido diana o un fragmento del mismo, y b) la detección de la presencia o ausencia de dicho polinucleótido diana amplificado o fragmento del mismo, y, opcionalmente, si está presente, la cantidad del mismo. Las realizaciones específicas de la presente descripción se refieren a la detección de variantes de splicing de AARS, tal como la detección de unión de splicing única de la variante de splicing, por hibridación, amplificación y otro procedimiento de detección.

Las realizaciones de la presente descripción incluyen una variedad de polipéptido de técnicas de detección basadas

en HRS, que incluyen técnicas de detección basadas en anticuerpos. En estas realizaciones de la presente descripción se incluye el uso de polipéptidos de HRS para detectar, cuantificar o cartografiar mediante epítomos anticuerpos anti-HRS en una muestra biológica, tal como suero, sangre entera o plasma. Algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear metodologías estándar y detectores tales como western blot e inmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), citometría de flujo y ensayos de inmunofluorescencia (IFA), que usan un dispositivo de imagen.

Dichos polipéptidos de HRS humanos poseen sorprendentemente características superiores de unión de anticuerpos en comparación con las metodologías preexistentes de detección de anticuerpos que se basan en preparaciones de histidil-tRNA sintetasa no humanas y/o en bruto.

En algunas realizaciones de estos ensayos el polipéptido de HRS es un polipéptido de HRS incluido en las **Tablas D1-D9** o deducible a partir de las mismas. En algunas realizaciones de la presente descripción el polipéptido de HRS comprende una etiqueta para facilitar la fijación a una superficie sólida. En una realización de la presente descripción la etiqueta es una etiqueta poli-his.

Por consiguiente, en algunas realizaciones de la presente descripción los polipéptidos de HRS pueden usarse para el perfil de pacientes con el fin de identificar su carga patológica de anticuerpos Jo-1. Dichos perfiles permiten la selección de pacientes en subpoblaciones que se beneficiarían el tratamiento con polipéptidos de HRS, pronosticar el probable resultado terapéutico y/o identificar el o los polipéptidos de HRS más adecuados para su uso como agentes terapéuticos.

En una realización la presente descripción incluye un procedimiento para identificar a un sujeto humano en riesgo de tener una respuesta inmunitaria adversa a la administración del polipéptido de HRS, que comprende a) la determinación del nivel de anticuerpos, o especificidad del epítomo del anticuerpo de anti-histidil-tRNA sintetasa en el sujeto; y b) la identificación del sujeto como en riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria adversa a la administración del polipéptido de HRS si el sujeto tiene anticuerpos detectables para histidil-tRNA sintetasa, o el polipéptido de HRS.

En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como en riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria adversa a la administración del polipéptido de HRS si el sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de más de aproximadamente 1 micromolar.

En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como en riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria adversa a la administración del polipéptido de HRS si el sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de más de aproximadamente 2 micromolar.

En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como de alto riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria adversa a la administración del polipéptido de HRS si el sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de más de aproximadamente 4 micromolar.

En otra realización la presente descripción incluye un procedimiento para la selección de un polipéptido de HRS para tratar a un sujeto humano con una afección autoinmunitaria o inflamatoria, que comprende a) la determinación del nivel de anticuerpos, o especificidad del epítomo del anticuerpo de anti-histidil-tRNA sintetasa en el sujeto; y b) la selección de un polipéptido de HRS que tiene una menor afinidad por el anticuerpo de anti-histidil-tRNA sintetasa en comparación con histidil-tRNA sintetasa de tipo no mutado.

En una realización la presente descripción incluye un procedimiento para pronóstico de la progresión de la enfermedad en un sujeto humano, que comprende a) la determinación del nivel de anticuerpos, o especificidad del epítomo del anticuerpo de anti-histidil-tRNA sintetasa en el sujeto; y b) la identificación del sujeto como en riesgo de desarrollar una enfermedad más grave si el sujeto tiene anticuerpos detectables para histidil-tRNA sintetasa, o el polipéptido de HRS.

En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como en riesgo de desarrollar una enfermedad más grave si el sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de más de aproximadamente 1 micromolar.

En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como en riesgo de desarrollar una enfermedad más grave si el sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de más de aproximadamente 2 micromolar.

En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como de alto riesgo de desarrollar una enfermedad más grave si el sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de más de aproximadamente 4 micromolar.

- 5 En otra realización la presente descripción incluye un procedimiento para predecir respuestas del sujeto a la administración del polipéptido de HRS, que comprende a) la determinación del nivel de anticuerpos, o especificidad del epítipo del anticuerpo de anti-histidil-tRNA sintetasa en el sujeto; y b) la identificación del sujeto como adecuado para la administración del polipéptido de HRS si el sujeto no tiene anticuerpos detectables para histidil-tRNA sintetasa, o el polipéptido de HRS.

10

En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como adecuado para la administración del polipéptido de HRS si el sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de menos de aproximadamente 1 micromolar.

- 15 En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como adecuado para la administración del polipéptido de HRS si el sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de menos de aproximadamente 0,1 micromolar.

- 20 En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto puede identificarse como adecuado para la administración del polipéptido de HRS si el sujeto tiene una concentración de anticuerpos de histidil-tRNA sintetasa en su suero de más de aproximadamente 0,01 micromolar.

- Algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear "matrices", tales como "micromatrices". En algunas realizaciones de la presente descripción, una "micromatriz" puede referirse también a una "micromatriz de péptidos" o una "micromatriz de proteínas" que tiene una colección o pluralidad de polipéptidos unidos a sustrato, siendo la unión a cada uno de la pluralidad de polipéptidos unidos detectable por separado. Alternativamente, la micromatriz de péptidos puede tener una pluralidad de aglutinantes, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, aglutinantes de presentación de fagos, aglutinantes híbridos de levaduras 2 y aptámeros, que pueden detectar específicamente la unión de los polipéptidos de HRS descritos en la presente memoria. La matriz puede basarse en la detección de autoanticuerpos de estos polipéptidos de HRS, tal como se describe, por ejemplo, en Robinson y col., *Nature Medicine* 8(3):295-301 (2002). Los ejemplos de matrices de péptidos pueden encontrarse en los documentos WO-02/31.463, WO-02/25.288, WO-01/94.946, WO-01/88.162, WO-01/68.671, WO-01/57.259, WO-00/61.806, WO-00/54.046, WO-00/47.774, WO-99/40.434, WO-99/39.210 y WO-97/42.507 y las patentes de EE.UU. nº 6.268.210, 5.766.960 y 5.143.854.

35

- Algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear MS u otros procedimientos basados en el peso molecular para detectar por medios diagnósticos secuencias de polipéptidos de HRS. La espectrometría de masas (MS) se refiere en general a una técnica analítica para determinar la composición elemental de una muestra o molécula. La MS puede usarse también para determinar las estructuras químicas de moléculas, tales como péptidos y otros compuestos químicos.

40

- En general, el principio de la MS consiste en ionizar compuestos químicos para generar moléculas o fragmentos de moléculas cargados, y a continuación medir sus relaciones masa-carga. En un procedimiento de MS ilustrativo: se carga una muestra en el instrumento MS, y se somete a vaporización, se ionizan los componentes de la muestra por uno de diversos procedimientos (por ejemplo, por impacto con un haz de electrones), que produce la formación de partículas con carga positiva, a continuación se aceleran los iones positivos por un campo magnético, se realizan cálculos sobre la relación masa-carga (m/z) de las partículas basándose en los detalles del movimiento de los iones a medida que transitan a través de campos electromagnéticos, y, la detección de los iones, que en la etapa anterior se ordenaron de acuerdo con m/z .

50

- Un instrumento ilustrativo de MS tiene tres módulos: una fuente de iones, que convierte las moléculas de muestra en fase gaseosa en iones (o, en el caso de ionización por electropulverización, mueve los iones que existen en solución en la fase gaseosa); un analizador de masas, que ordena los iones por sus masas aplicando campos electromagnéticos; y un detector, que mide el valor de una cantidad de indicador y así proporciona datos para calcular las abundancias de cada ion presente.

55

- La técnica MS tiene usos cualitativos y cuantitativos, lo que incluye la identificación de compuestos desconocidos, la determinación de la composición isotópica de los elementos en una molécula y la determinación de la estructura de un compuesto observando su fragmentación. Otros casos incluyen la cuantificación de la cantidad de un compuesto en una muestra o el estudio de los fundamentos de la química de iones en fase gaseosa (la química de iones y partículas neutras en el vacío). Se incluyen cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS o GC-MS),

60

cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC/MS o LC-MS) y espectrometría de movilidad de iones/espectrometría de masas (IMS/MS o IMMS). Por consiguiente, las técnicas de MS pueden usarse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos proporcionados en la presente memoria para medir la presencia o los niveles de un polipéptido AARS de la presente descripción en una muestra biológica, y para comparar dichos niveles con una muestra de control o un valor predeterminado.

Algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear clasificación celular o visualización de células o dispositivos/técnicas de imagen para detectar o cuantificar la presencia o los niveles de polinucleótidos o polipéptidos AARS. Los ejemplos incluyen citometría de flujo o FACS, análisis de inmunofluorescencia (IFA) y técnicas de hibridación *in situ*, tales como hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

Algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear procedimientos de biología, software y sistemas convencionales para fines diagnósticos. Los productos de software informático de la presente descripción incluyen normalmente medios legibles por ordenador que tienen instrucciones ejecutables por ordenador para realizar las etapas lógicas del procedimiento de la presente descripción. Los medios legibles por ordenador adecuados incluyen disco flexible, CD-ROM/DVD/DVD-ROM, unidad de disco duro, memoria flash, ROM/RAM, cintas magnéticas, etc. Las instrucciones ejecutables por ordenador pueden estar escritas en un lenguaje informático adecuado o una combinación de varios lenguajes. Los procedimientos básicos de biología computacional se describen, por ejemplo en Setubal y Meidanis y col., *Introduction to Computational Biology Methods* (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg, Searles, Kasif, (Ed.), *Computational Methods in Molecular Biology*, (Elsevier, Ámsterdam, 1998); Rashidi y Buehler, *Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine* (CRC Press, Londres, 2000) y Ouelette y Bzevanis *Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins* (Wiley & Sons, Inc., 2ª ed., 2001). Véase la patente de EE.UU. nº 6.420.108.

Algunas realizaciones de la presente descripción pueden emplear varios productos de programas informáticos para diversos fines, tales como diseño de sondas, gestión de datos, análisis y funcionamiento de instrumentos. Véanse las patentes de EE.UU. nº 5.593.839, 5.795.716, 5.733.729, 5.974.164, 6.066.454, 6.090.555, 6.185.561, 6.188.783, 6.223.127, 6.229.911 y 6.308.170.

El ensayo de muestreo de genoma completo (WGSA) se describe, por ejemplo en Kennedy y col., *Nat. Biotech.* 21, 1233-1237 (2003), Matsuzaki y col., *Gen. Res.* 14: 414-425, (2004), y Matsuzaki, y col., *Nature Methods* 1:109-111 (2004). Los algoritmos para su uso con ensayos de cartografía se describen, por ejemplo, en Liu y col., *Bioinformatics.* 19: 2397-2403 (2003) y Di y col. *Bioinformatics.* 21:1958 (2005). Los procedimientos adicionales relacionados con WGSA y matrices útiles para WGSA se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patente de EE.UU. nº 60/676.058 presentada el 29 de abril de 2005, 60/616.273 presentada el 5 de octubre de 2004, 10/912.445, 11/044.831, 10/442.021, 10/650.332 y 10/463.991. Los estudios de asociación amplia de genomas que usan ensayos de cartografía se describen en, por ejemplo, Hu y col., *Cancer Res.*; 65(7):2542-6 (2005), Mitra y col., *Cancer Res.*, 64(21):8116-25 (2004), Butcher y col., *Hum Mol Genet.*, 14(10):1315-25 (2005), y Klein y col., *Science.* 308(5720):385-9 (2005).

Además, algunas realizaciones de la presente descripción pueden incluir procedimientos para proporcionar información genética sobre redes tales como Internet como se muestra, por ejemplo, en las solicitudes de EE.UU. nº 10/197.621, 10/063.559 (número de publicación de Estados Unidos 2002/0183.936), 10/065.856, 10/065.868, 10/328.818, 10/328.872, 10/423.403 y 60/482.389.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

PRODUCCIÓN DE RESOKINE CON HIS-TAG (HRS(1-60))

Optimización de codones y síntesis de genes

Se aplicó optimización de codones en un ADN que codifica Resokine (HRS(1-60)) para expresión de *E. coli* usando el algoritmo desarrollado por DNA2.0 (Menlo Park, CA). El gen se sintetizó con una etiqueta 6xHis en el extremo C y se subclonó en el vector pJexpress411 donde se usó el promotor T7 para impulsar la transcripción y se usó la resistencia a la kanamicina para la selección de antibióticos. La secuencia de ADN con optimización de codones es la siguiente:

ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAACTGCAAGGTGAACGTGTTCGTGG
TCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGATCGAAGAAGAGGTGGCCAACTGCTG
AAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCCGACGAGAGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCC
GAAACACCACCATCACCATCAC (SEQ ID NO:40)

La secuencia de proteínas traducida es la siguiente:

MAERAALEELVKLQGERVRGLKQKASAEIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKH

5 HHHHH (SEQ ID NO:41)

Cepa de expresión. Se transformaron células competentes BL21(DE3) (Novagen, n° cat. 69450) con la construcción de expresión con optimización de codones. Brevemente, se añadió el plásmido (1 µL) en 50 µL de las células competentes. Se mezcló la reacción y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se aplicó choque de calor a la
10 reacción a 42°C durante 30 segundos seguido por un choque de frío en hielo durante 2 minutos. A continuación se añadió el medio SOC (500 µL) y se incubó el tubo a 37°C, 250 rpm durante 1 hora. Finalmente, se extendió una parte alícuota del cultivo (50 µL) en la placa de kanamicina (Teknova S9641) y se incubó a 37°C durante toda la noche. Se tomó una sola colonia y se usó para aumento de escala de expresión.

15 **Medio.** El medio M9YE se preparó mezclando 200 mL de sal mínima M9 estéril 5X (BD248510), 778 mL de 30 g/L de extracto de levaduras en agua purificada estéril (BD212750), 20 mL de glucosa al 20% esterilizada (Sigma G7021) y 2 mL de MgSO₄ 1,0 M estéril (Sigma M7506). La solución de alimentación contiene extracto de levaduras al 5%, glucosa al 50%, elementos traza y 2 g/L de sulfato de magnesio. Se añadió sulfato de kanamicina (Invitrogen 15160) a una concentración final de 100 µg/mL en M9YE y solución de alimentación.

20 **Fermentación de lote alimentado.** Se usó un fermentador de 4 L (Sartorius Biostat B plus) con software MFCS/DA para la fermentación de lote alimentado. La agitación se fijó a 1.000 rpm. El valor de pH se controló a 7,0 automáticamente mediante la adición de hidróxido de amonio al 30% (Sigma 221228) y ácido fosfórico al 30% (Sigma P5811). El aire se proporcionó a una velocidad de flujo de 4 L/min con un compresor de aire de diafragma sin
25 aceite (Cole-Parmer). El aire se hizo pasar a través de un filtro Midisart 2000 de 0,2 µm (Sartorius 17805). El oxígeno puro (West Air) se suministró automáticamente para controlar el nivel de oxígeno disuelto al 70%. La temperatura se controló a 30°C con un circulador Neslab RTE7 (Thermo Scientific). La formación de espuma se controló mediante la adición del antiespumante 204 (Sigma A8311). El volumen inicial de medio M9YE en el fermentador fue de 3 L. El fermentador se inoculó con 150 mL del cultivo de siembra cultivado durante toda la noche
30 a 30°C y 250 rpm. Cuando se agotó la glucosa en el vaso, la solución de alimentación concentrada se introdujo en el vaso mediante una bomba peristáltica ajustada a 0,9 mL/min. Cuando la densidad óptica de las células a 600 nm alcanzó aproximadamente 30, el cultivo se indujo con IPTG 0,5 mM (Fisher Scientific BP1755). El cultivo se mantuvo durante toda la noche (fase de lote alimentado de aproximadamente 18 horas) y se recogió por centrifugación a 6.000 x g durante 1 hora. El sedimento celular se almacenó a -20°C hasta purificación. La expresión de Resokine se
35 confirmó en SDS-PAGE.

Purificación de Resokine. Se resuspendió una pasta celular congelada (70 g) en 280 mL (es decir, 4 mL/g de pasta celular) de tampón de lisis (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, β-ME 5 mM, pH 7,5). Se añadieron a la suspensión comprimidos de inhibidor de proteasa EDTA-FREE completo (Roche) en una proporción de 1
40 comprimido/50 mL. Se hizo pasar la suspensión a través de un microfluidizador (Microfluidics) dos veces a 15.000 psi con enfriamiento con hielo. Se centrifugó el lisado a 15.000 x g durante 30 min a 4°C. Se filtró el sobrenadante a través de filtros de cápsulas Acropak 400 de 0,45+0,22 µm (Pall).

El lisado aclarado se unió a la resina Ni-NTA (Qiagen), se preequilibró con tampón de unión Ni-NTA (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 7,5). Se lavó la columna con 50 volúmenes de columna de tampón de unión Ni-NTA + Tritón X-114 al 0,1% seguido por 20 volúmenes de columna del tampón de unión Ni-NTA. La proteína de unión, Resokine, se eluyó con 4 volúmenes de columna de tampón de elución Ni-NTA (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 300 mM, pH 7,5).

50 El eluato Ni-NTA se purificó adicionalmente mediante una columna de intercambio de cationes. Específicamente, el eluato Ni-NTA se diluyó 20 veces con el tampón de unión SP (fosfato de Na 10 mM, pH 7,0) y se cargó en una columna HP de SP-sefarosa de 33 mL, se preequilibró con el tampón de unión SP. La dimensión de la columna era de 2,6 cm de diámetro a una altura de 6,2 cm. El producto deseado se eluyó de la columna con un gradiente lineal de 0-0,5 M NaCl en el tampón de unión SP sobre 10 volúmenes de columna. La proteína purificada se concentró a 6

mg/mL, el tampón se intercambió en PBS (producto Invitrogen # 10010), y se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm. El rendimiento de proteína purificada fue de 150 mg (de 70 g de pasta celular), y su nivel de endotoxinas fue < 1,7 UE/mg.

5 EJEMPLO 2

PRODUCCIÓN DE HISTIDIL-TRNA SINTETASA CON ETIQUETA HIS DE LONGITUD COMPLETA (HRS)

Optimización de codones y síntesis de genes. El gen HisRS de longitud completa se sometió a optimización de codones para expresión de *E. coli* y se subclonó en vector pET21a donde el promotor T7 se usó para impulsar la transcripción. Además, se unió un conector 5-aminoácido y una etiqueta His 6x al extremo C.

La secuencia de ADN es la siguiente:

15 ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGAACGCGTACGTGG
TCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGAAGAAGAAGTTGCCAAATTACTGA
AACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGATGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCC
AAAGGAACCCGTGATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTTCGACGTT
ATTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGTATTTGAATTG
AAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAAACTGATTTATGATTTGAAAGA
CCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCGCTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTT
AGCCATGAATAAaTTaACCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGA
CAACCCTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGATATTGC
CGGAAATTTGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTGTTGAAAATTATGTGTGAAATTCT
GAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTAAGTAAATGACCGCCGTATTCTGGATGG
TATGTTTGCTATTTGCGGTGTTTCTGATTCCAAATTCGTAACAATCTGCTCAAGCGTGGAC
AAATTGGATAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAGGCC
TGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGAATGTTCAACAACATGGCGGTGTGTCCT
TAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGAGCCAAAATAACAAGCACTTGAAGGA
CTGGGAGATCTGAAATTACTCTTTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATT
AGCTTTGATCTGAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT
GTTCTCTTGCAAACCCAGCCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTCGGCAGTGTGGC
AGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTTGACCCTAAAGGCCGTAAAGTACC
ATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTGCAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAA
GCTTTGGAGGAAAAGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAA
AAACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGGCATCAAGGC
CGAACTGCTGTATAAAAAAGAACCCGAAATTGTAAACCAACTCCAGTATTGTGAAGAAG
CTGGGATCCCCTCGTAGCTATTATTGGTGAGCAAGAATTAAGATGGCGTGATTAAAC
TGCCTTCAGTAACAAGCCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAA
ATTAAACGCCGCACCGGTCAACCGTTATGTATTTGCGCGGCCGCACTCGAGCACCACCAC
CACCACCACTGA (SEQ ID NO:42)

La secuencia de la proteína traducida es la siguiente:

20

MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKG
 TRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGE
 LLSRLYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDP
 MIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRRLDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE E
 VKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEY
 LTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVYIEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMF
 DPKGRKVPVCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVS ELWD
 AGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVE
 EIKRRTGQPLCICAAALEHHHHHH (SEQ ID NO:43)

Cepa de expresión. Se transformaron células competentes BL21(DE3) (Novagen, nº cat. 69450) con la construcción de expresión con optimización de codones. Brevemente, se añadió el plásmido (1 µL) en 50 µL de las células competentes. Se mezcló la reacción y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se aplicó choque de calor a la reacción a 42°C durante 30 segundos seguido por un choque de frío en hielo durante 2 minutos. A continuación se añadió el medio SOC (500 µL) y se incubó el tubo a 37°C, 250 rpm durante 1 hora. Finalmente, se extendió una parte alícuota del cultivo (50 µL) en la placa de ampicilina (Teknova S9641) y se incubó a 37°C durante toda la noche. Se recogió una sola colonia y se usó para aumento de escala de expresión.

Medio. Se preparó medio M9YE mezclando 200 mL de sal mínima M9 estéril 5X (BD248510), 778 mL de 30 g/L de extracto de levaduras en agua purificada estéril (BD212750), 20 mL de glucosa al 20% esterilizada (Sigma G7021) y 2 mL de MgSO₄ 1,0 M estéril (Sigma M7506). La solución de alimentación contiene extracto de levaduras al 5%, glucosa al 50%, elementos traza y 2 g/L de sulfato de magnesio. Se añadió ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL en M9YE y solución de alimentación.

Fermentación de lote alimentado. Se usó un fermentador de 4 L (Sartorius Biostat B plus) con software MFCS/DA para la fermentación de lote alimentado. La agitación se fijó a 1.000 rpm. El valor de pH se controló a 7,0 automáticamente mediante la adición de hidróxido de amonio al 30% (Sigma 221228) y ácido fosfórico al 30% (Sigma P5811). El aire se proporcionó a una velocidad de flujo de 4 L/min con un compresor de aire de diafragma sin aceite (Cole-Parmer). El aire se hizo pasar a través de un filtro Midisart 2000 de 0,2 µm (Sartorius 17805). El oxígeno puro (West Air) se suministró automáticamente para controlar el nivel de oxígeno disuelto al 70%. La temperatura se controló a 30°C con un circulador Neslab RTE7 (Thermo Scientific). La formación de espuma se controló mediante la adición del antiespumante 204 (Sigma A8311). El volumen inicial de medio M9YE en el fermentador fue de 3 L. El fermentador se inoculó con 150 mL del cultivo de siembra cultivado durante toda la noche a 30°C y 250 rpm. Cuando se agotó la glucosa en el vaso, la solución de alimentación concentrada se introdujo en el vaso mediante una bomba peristáltica ajustada a 0,9 mL/min. Cuando la densidad óptica de las células a 600 nm alcanzó aproximadamente 30, el cultivo se indujo con IPTG 0,5 mM (Fisher Scientific BP1755). El cultivo se mantuvo durante toda la noche (fase de lote alimentado de aproximadamente 18 horas) y se recogió por centrifugación a 6.000 x g durante 1 hora. El sedimento celular se almacenó a -20°C hasta purificación. La expresión de HisRS se confirmó en SDS-PAGE.

Purificación de HisRS. Se resuspendió pasta celular congelada (40 g) en 160 mL (es decir, 4 mL/g de pasta celular) de tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 400 mM, imidazol 20 mM, β-ME 14 mM, pH 8,0 a 4°C). Se añadieron a la suspensión comprimidos de inhibidor de proteasa EDTA-FREE completo (Roche) en una proporción de 1 comprimido/50 mL. Se hizo pasar la suspensión a través de un microfluidizador (Microfluidics) dos veces a 15.000 psi con enfriamiento con hielo. Se centrifugó el lisado a 35.000 x g durante 45 min a 4°C. Se filtró el sobrenadante a través de filtros de cápsulas Acropak 200 de 0,22 µm (Pall).

El lisado aclarado se unió a la resina Ni-NTA (Qiagen), se preequilibró con tampón de unión Ni-NTA (Tris 20 mM, NaCl 400 mM, imidazol 20 mM, β-ME 5 mM, pH 8,0 a 4°C). Se lavó la columna con 500 volúmenes de columna de tampón de unión Ni-NTA + Tritón X-114 al 0,1% seguido por 50 volúmenes de columna del tampón de unión Ni-NTA. La proteína de unión, HisRS, se eluyó con 5 volúmenes de columna de tampón de elución Ni-NTA (Tris 20 mM, NaCl 400 mM, imidazol 500 mM, β-ME 5 mM, pH 8,0 a 4°C).

El eluato Ni-NTA se purificó adicionalmente mediante una columna de intercambio de iones. Específicamente, el eluato de Ni-NTA se dializó frente a tampón de unión Q (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, pH 7,4) y se cargó en una columna de Q-sefara de 5 mL, se preequilibró con el tampón de unión Q. El producto deseado se eluyó de la

columna con un gradiente lineal de NaCl 0-1 M en el tampón de unión Q sobre 10 volúmenes de columna. Se concentró el HisRS purificado y el tampón se intercambió en PBS (producto Invitrogen # 10010) + DTT 1 mM, y se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm.

5 EJEMPLO 3

EVALUACIÓN DE RESOKINE (HRS(1-60)) COMO UN AGENTE INFLAMATORIO

Para evaluar la propiedad antiinflamatoria potencial de los polipéptidos derivados de HRS, se sometió a prueba una variante de splicing de origen natural en el terminal N que comprendía los aminoácidos 1-60 de HRS (Resokine) en un modelo de colitis inducido por TNBS (Epistem, Ltd, RU).

Las formas más comunes de enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, son trastornos inflamatorios crónicos y progresivos del aparato digestivo. La enfermedad de Crohn afecta normalmente al íleon y al colon mientras que la colitis ulcerosa afecta normalmente sólo a la mucosa más interior del colon y el recto. Los síntomas de enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa son en general similares con dolor abdominal y diarrea. En colitis ulcerosa moderada o grave, a menudo se observan heces con sangre. En la actualidad, la EII no tiene curación. Se usan normalmente fármacos y sustancias biológicas para tratar los síntomas, inducir la remisión y prevenir recidivas. A menudo los fármacos antiinflamatorios tales como sulfasalacina, mesalamina y corticoesteroides son medicamentos de primera línea para el tratamiento de EII con el fin de inducir la remisión, mientras que los supresores del sistema inmunitario se usan en general para ayudar a mantener la remisión. Los moduladores del sistema inmunitario más comunes usados para tratar EII son azatioprina, mercaptopurina y terapias biológicas tales como factor de necrosis antitumoral (anti-TNF-α).

El desarrollo de modelos animales de EII ha contribuido a comprender y descubrir terapias para EII. Los modelos de roedores con colitis por sulfato de dextrano (DSS) y ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) han revelado que la gravedad de la pérdida de peso, la histopatología del colon y los valores de endoscopia se correspondían con el grado de cambios en las citocinas y quimiocinas proinflamatorias que atraen preferentemente infiltrado de neutrófilos y metaloproteinasas de matriz. Estos modelos de roedores de EII se han usado también para validar un enfoque computacional dirigido a identificar nuevas terapias farmacológicas posibles para EII.

Los estudios se realizaron en ratones BDF-1 macho, con 12 ratones/grupo; todos los ratones en los grupos de tratamiento recibieron 3 mg de TNBS en etanol/solución salina al 50% por instilación colónica en el día de estudio 0 con el fin de inducir colitis, y se añadió Budesonida a 5 mg/kg oralmente como un control positivo.

En este estudio se administró Resokine diariamente por inyección i.v., empezando 3 horas antes del tratamiento con TNBS, a una concentración de 1 ó 5 mg/kg. Los datos, mostrados en la **Figura 1** revelan que el tratamiento con Resokine (HRS(1-60)) a cualquier concentración produjo una disminución significativa en la supervivencia. Por consiguiente Resokine parece tener potentes efectos antiinflamatorios, consistentes con la hipótesis de que los polipéptidos de HRS intervienen en el control local de los procesos inflamatorios.

Para comparar HRS(1-60) directamente con HRS (1-506) se llevó a cabo un estudio TNBS repetido mediante Biomodels (MA, EE.UU., en ratones C57BL/6).

Diseño del estudio: Un grupo de control sin tratamiento consistió en 5 ratones con administración intrarrectal de vehículo para TNBS (Grupo 1). Se administró TNBS (4 mg/100 µL de etanol al 50%) al Grupo 2 (15 ratones/grupo) y 10 ratones/grupo para los Grupos 3-7 en el Día 0. Los Grupos 2 y 4-7 recibieron administración intravenosa q.d. de vehículo, HRS(1-506), 3 y 1 mg/kg, y aTyr1920 5 y 1 mg/kg, respectivamente, de los Días -1 a 5. El Grupo 3 recibió administración oral de 2 mg/kg de Prednisolona q.d. de los Días -1 a 5. Se pesó a los animales todos los días. Todos los animales fueron sometidos a videoendoscopia en los Días 3 y 5 para valorar la extensión de la colitis y si podían observarse efectos beneficiosos del tratamiento. Todos los animales supervivientes se sacrificaron en el Día 5 para obtener tejidos de colon para medidas de peso y longitud y para estudio patológico.

Métodos: Se realizó endoscopia en modo ciego usando un pequeño endoscopio para animales (Karl Storz Endoskope, Alemania). Para evaluar la gravedad de la colitis, se anestesió a los animales con isoflurano y se les sometió a videoendoscopia del colon inferior. La colitis se valoró visualmente en una escala de 5 puntos comprendida entre 0 para normal, y 4 para úlceras graves. En términos descriptivos, esta escala se define tal como se representa en la **Tabla E1**. A cada ratón se le asignó una única puntuación que correspondía al daño más grave observado a lo largo del colon. En el Día 5, los animales fueron sacrificados y se les extirpó el colon, se lavó, se pesó y se midió la longitud.

Tabla E1.	
Escala de valoración de colitis en endoscopia	
Puntuación	Descripción:
0	Normal
1	Pérdida de vascularidad
2	Pérdida de vascularidad y friabilidad
3	Friabilidad y erosiones
4	Úlceras y hemorragia

La histología se valoró examinando el colon extendido a los 5 cm inferiores de cada animal que se cortó y se fijaron secciones de 2 cm de cada extremo en formalina al 10%, se integraron, se seccionaron a aproximadamente 5 micrómetros y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E) para análisis histológico. La sección de 1 cm central del colon se congeló y se almacenó a -80°C. Las secciones de tejido fueron examinadas por un patólogo veterinario con certificación y experiencia especial en patología GI en modo ciego. A cada sección se le asignó una puntuación de inflamación, edema y necrosis/pérdida epitelial usando una escala de 5 puntos de acuerdo con los criterios recogidos en la **Tabla E2**. Se promediaron las puntuaciones de cada una de las 4 secciones para obtener una única puntuación media por ratón y por parámetro. También se comunicó la puntuación media de las sumas, que es la suma de las tres puntuaciones de parámetros.

Tabla E2	
Escala de valoración de colitis en histología	
Inflamación	
Valoración	Descripción
0	Nada presente
1	Focos raros; mínimo
2	Agregados dispersos o inflamación difusa leve
3	Numerosos agregados o inflamación difusa moderada
4	Inflamación difusa acusada
Edema	
Valoración	Descripción
0	Nada presente
1	Focos raros; mínimo
2	Regiones dispersas o edema difuso leve
3	Numerosas regiones o edema difuso moderado
4	Edema difuso acusado
Necrosis/pérdida epitelial	
Valoración	Descripción
0	Nada presente
1	< 25% de la mucosa afectada
2	26-50% de la mucosa afectada
3	51-75% de la mucosa afectada
4	> 76% de la mucosa afectada

Resultados: Todos los animales tratados con TNBS perdieron un peso corporal notable en el Día 1 y empezaron a ganar peso de nuevo en los Días 3 ó 4. En los Días 3 y 5, el tratamiento con 1 y 3 mg/kg de HRS(1-506) o 1 y 5 mg/kg de HRS(1-60) produjo una disminución leve o moderada en las puntuaciones de colitis (**Tabla E3**). El tratamiento con 3 mg/kg de HRS(1-506) produjo consistentemente el mayor descenso en las puntuaciones de colitis en comparación con otros grupos de tratamiento en los Días 3 y 5. (**Tabla E3**). El tratamiento con 2 mg/kg de Prednisolona produjo una ligera disminución en las puntuaciones de colitis en el Día 5 pero no tuvo efecto en el Día 3. El tratamiento con 1 y 3 mg/kg de HRS(1-506) o 1 y 5 mg/kg de HRS(1-60) produjo disminuciones insignificantes de inflamación, edema, necrosis/pérdida epitelial y puntuaciones de suma en comparación con el tratamiento con TNBS + vehículo (**Tabla E3**).

Tabla E3					
Resumen de puntuaciones de patología					
Grupo	Tratamiento	Puntuación media $\pm$ EEM			
		Inflamación	Edema	Necrosis	Suma
1	--	0,00 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,04
2	Vehículo	0,68 $\pm$ 0,08	0,79 $\pm$ 0,10	0,43 $\pm$ 0,09	1,89 $\pm$ 0,20
	(i.v.)				
3	Prednisolona	0,72 $\pm$ 0,14	0,71 $\pm$ 0,16	0,61 $\pm$ 0,15	2,05 $\pm$ 0,42
	2 mg/kg (p.o.)				
4	HRS (1-506)	0,37 $\pm$ 0,06	0,38 $\pm$ 0,08	0,27 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,15
	3 mg/kg (i.v.)				
5	HRS (1-506)	0,47 $\pm$ 0,08	0,48 $\pm$ 0,10	0,37 $\pm$ 0,07	1,32 $\pm$ 0,23
	1 mg/kg (i.v.)				
6	HRS (1-60)	0,50 $\pm$ 0,10	0,65 $\pm$ 0,16	0,35 $\pm$ 0,08	1,50 $\pm$ 0,30
	5 mg/kg (i.v.)				
7	HRS (1-60)	0,49 $\pm$ 0,08	0,52 $\pm$ 0,15	0,33 $\pm$ 0,06	1,34 $\pm$ 0,27
	1 mg/kg (i.v.)				

Conclusión: En un modelo de ratón de colitis inducida por TNBS, el tratamiento intravenoso con HRS(1-60) a 1 y 5 mg/kg y HRS(1-506) a 1 y 3 mg/kg produjo disminuciones significativas en las puntuaciones de colitis endoscópicas y puntuaciones patológicas de inflamación, edema, necrosis/pérdida epitelial y puntuación de suma. No se observaron efectos adversos atribuidos al tratamiento con HRS(1-60), HRS(1-506) o prednisolona. Estos resultados confirman los estudios previos y establecen además un papel antiinflamatorio para los polipéptidos de HRS en enfermedades y trastornos inflamatorios tales como EII.

10 EJEMPLO 4

TITULACIÓN DEL SITIO ACTIVO DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN HARS DE LONGITUD COMPLETA

- Para determinar la posición y la identidad de los residuos de cisteína expuestos en superficie en HARS de longitud completa, la proteína purificada recombinante se incubó con yodoacetamida en condiciones naturales y desnaturalizadas para alquilar cualquier residuo de cisteína expuesto en superficie. A continuación se analizaron las muestras mediante proteólisis limitante seguido por análisis de LC-masas para determinar la posición y la identidad de los residuos de cisteína modificados.
- Para realizar los estudios de alquilación, en primer lugar se redujo totalmente HRS marcado con polihistidina de longitud completa (6,65 mg/ml en PBS, glicerol al 10%, DTT 2 mM, pH 7,4, (Ejemplo 2) por incubación con DTT 10 mM durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las incubaciones con yodoacetamida se realizaron con una concentración de yodoacetamida a 30 mM ("baja") o a 100 mM ("alta") durante 30 minutos en oscuridad, y se realizaron en muestras de HARS naturales y desnaturalizadas para confirmar que la reacción se desarrolló con éxito.
- Se preparó HARS desnaturalizado por preincubación de la proteína con guanidina 4 M durante 45 min a 50°C. Después de la incubación con yodoacetamida, se dializaron las muestras en PBS pH 7,4 a 4°C usando una membrana de diálisis de corte en peso molecular 10 kDa, y con al menos 3 intercambios de tampón, y a continuación se usó para análisis por espectroscopia de masas tal como se describe más adelante.
- En resumen, las muestras se prepararon por dilución de las proteínas en ácido fórmico al 0,1% a una concentración final de 1 mg/ml y 5 µg de las muestras de las proteínas se inyectaron y se analizaron mediante HPLC de fase inversa seguido por análisis de espectro de masas usando un espectrómetro de masas Agilent TOF. Las muestras se separaron primero en una columna HPLC C3 (Agilent ZORBAX 300SB-C3, 5 µm, columna 2,1 x 150 mm) usando un gradiente lineal de (fase móvil B del 2-60%) sobre 18 min (fase móvil A: ácido fórmico al 0,1%; fase móvil B: ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo). El análisis de espectrometría de masas de las muestras se realizó en modo perfil. Los datos se adquirieron y se analizaron mediante MassHunter (Agilent). El peso molecular medido se calculó por MassHunter Bioconfirm (Agilent).

- Los resultados (datos no mostrados) mostraron que en condiciones naturales sólo 3 ó 4 residuos de cisteína son modificados fácilmente, mientras que por comparación cuando la proteína primero se desnaturaliza para romper su conformación natural las 10 cisteínas se desnaturalizaron fácilmente.

Para identificar la identidad de los residuos de cisteína modificados, se sometieron las muestras antes y después de

- la incubación con yodoacetamida a desnaturalización en guanidina HCl 4 M a 37°C durante 30 min seguido por escisión proteolítica con LysC usando una proporción de 10:1 (p/p) a temperatura ambiente durante 20 h. Se analizaron las digestas de proteínas por LC/MS/MS usando espectrómetro de masas Dionex HPLC y Thermo LTQ XL. Primero se separaron las muestras en columna HPLC C18 (Agilent ZORBAX 300SB-C18, 5 µm, 2,1 x 150 mm) usando un gradiente de fase móvil B (fase móvil A: ácido fórmico al 0,1%; fase móvil B: ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo). El gradiente termina con un 1-3% de B en 10 min y después un 40% de B en 76 min. Se analizaron las digestas de proteínas por MS completa en modo perfil o por una exploración MS completa o se analizaron por exploración MS/MS en tándem en los tres iones superiores identificados. Los datos se adquirieron y analizaron por Xcalibur (Thermo). La secuenciación de péptidos se basó en los espectros MS/MS de cada péptido, en los que los picos de iones b e y se corresponden con sus iones teóricos. La identificación de los péptidos y la cartografía de los sitios de modificación se basan en el peso molecular y se confirman mediante secuenciación de péptidos usando espectros MS/MS, y se recogen en la **Tabla E4**.

Tabla E4				
Resultados de cartografía de péptidos LC-MS después de limitar la digestión de tripsina				
Res. Cys	De - a	Secuencia	RT (min)	MH+
Cys83	76-85	VFDVIR C FK (SEQ ID NO: 190)	56,24	1239,68
Cys174	155-	VYRRDNPAMTRGRYREFYQ C DFDIAGNFDPMPDAE C LK (SEQ ID NO: 191)	61,27	4673,14
Cys191	193			
Cys196	194-210	IM C EILSSLQIGDFLVK (SEQ ID NO: 192)	73,14	1909,01
Cys224	211-230	VNDRRILDGMFAI C GVSDSK (SEQ ID NO: 193)	58,53	2196,08
Cys235	231-240	FRTI C SSVDK (SEQ ID NO: 194)	22,8	1155,57
Cys235	231-243	FRTI C SSVDKLDK (SEQ ID NO: 195)	28,77	1511,79
Cys379	377-403	VP C VGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEK (SEQ ID NO: 196)	81,00	3013,63
Cys445	448-472	LLNQLQY C EEAGIPLVAIIGEQELK (SEQ ID NO: 197)	72,46	2784,48
Cys505	500-509	RRTGQPL C C (SEQ ID NO: 198)	27,17	1146,57
Cys509				

- Los resultados revelaron (datos no mostrados) que Cys235, Cys507 y Cys509 son modificados fácilmente por tratamiento con yodoacetamida y así es probable que sean residuos expuestos en superficie que pueden prepararse fácilmente para modificación química.

EJEMPLO 5

20

CREACIÓN DE POLIPÉPTIDOS DE HRS MODIFICADOS CON CONTENIDO DE CISTEÍNAS ALTERADO

- Para determinar si alguno de los 10 residuos de cisteína de origen natural en HRS de longitud completa podría mutarse en residuos de aminoácidos de origen natural alternativos, o suprimidos, se diseñaron cebadores para mutar selectivamente cada residuo de cisteína. Para lograrlo, pueden usarse cebadores basados en los siguientes (véase **Tabla E5**).

Tabla E5		
Mutación	Secuencia oligo	SEQ ID NO:
C83	5'-GTTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAG-3' (Directa)	199
C83	5'-CTGCACCGTGGCGCTTGAAGCAACGGATGATTACGTCAAAC -3' (Inversa)	200
C174	5'-GCCGATACCGGAATTCTACCAAGTGTGATTTGACATTGCTGGG-3' (Directa)	201
C174	5'-CCCAGCAATGTCAAATCACACTGGTAGAATCCCGGTATCGGC -3' (Inversa)	202

C191	5'-CCATGATCCCTGATGCAGAGTGCCTGAAGATCATGTGCGAG-3' (Directa)	203
C191	5'-CTCGCACATGATCTTCAGGCACTCTGCATCAGGGATCATGG -3' (Inversa)	204
C196	5'-GCAGAGTGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCACTTC-3' (Directa)	205
C196	5'-GAAGTGAACCTCAGGATCTCGCACATGATCT TCAGGCACTCTG C - 3' (Inversa)	206
C224	5'- CTAGATGGGATGTTTGCTATCTGTGGTGTTCCTGACAGCAAGTTC-3' (Directa)	207
C224	5'-GAACTTGCTGTCAGAAACACCACAGATAGCAAACATCCCATCTAG -3' (Inversa)	208
C235	5'-CAGCAAGTTCCGTACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCTGG-3' (Directa)	209
C235	5'- CCA GCT TGTCTACTGAGGAGCAGATGGTACGGAACCTTGCTG -3'	210
C379	5'-GGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGG-3' (Directa)	211
C379	5'- CCC CAA TGC TGA GCC CCA CAC ATG GCA CCT TGC GCC C - 3' (Inversa)	212
C455	5'-CTGAACCAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCC-3' (Directa)	213
C455	5'- GGGATGCCTGCCTCCTCACAGTACTGTAACCTGG TTCAG -3' (Inversa)	214
C507	5'-GAGAACAGGCCAGCCCCTCTGCATCTGCTAGAACCCAGC-3' (Directa)	215
C507	5'- GCTGGGTTCTAGCAGATGCAGAGGGGCTGGCCTGTTCTC -3' (Inversa)	216
C509	5'-CCAGCCCCTCTGCATCTGCTAGAACCCAGCTTTCTTG-3' (Directa)	217
C509	5'- CAAGAAAGCTGGGTTCTAGCAGATGCAGAGGGGCTGG -3' (Inversa)	218
Eliminación de 3 últimos codones	5' GAACAGGCCAGCCCCTCTAGAACCCAGCTTTCTTG 3' (Directa)	219
Eliminación de 3 últimos codones	5'- CAAGAAAGCTGGGTTCTAGAGGGGCTGGCCTGT TC -3' (Inversa)	220

Para confirmar los datos de valoración del sitio activo, se analizó la estructura cristalina de HRS de longitud completa usando el programa Getarea1.1 para valorar la posición relativa de los 10 residuos de cisteína. Los resultados (datos no mostrados) sugieren que además de Cys235, Cys507 y Cys509, las cisteínas en las posiciones Cys174, Cys191 y Cys224 de la SEQ ID NO: 1 están expuestas al menos parcialmente a la superficie y probablemente podrían ser modificadas por medio de reactivos estándar. Además el análisis de la estructura cristalina de HRS sugiere que Cys174 y Cys191 son capaces de formar un enlace de disulfuro interno, mientras que Cys507 y Cys509 son capaces de formar enlaces entre cadenas de disulfuro en el dímero de HRS, lo que contribuye potencialmente a la microheterogeneidad que podría eliminarse de forma beneficiosa.

10

Para valorar directamente la importancia de los dos residuos de cisteína en el extremo C para contribuir a la formación de enlaces de disulfuro entre cadenas, se compararon versiones marcadas en His de las versiones de HRS de longitud completa y suprimidas en el extremo C (HRS(1-506)) mediante análisis SDS-PAGE antes y después de la reducción, tal como se describe más adelante. Los resultados, mostrados en la **Figura 2**, revelan que HRS de longitud completa es una mezcla ~50:50 de dímero no covalente y unido a SS, mientras que HRS(1-506) reduce de forma sustancial el dímero ligado a SS. La comparación de las dos proteínas por ELISA competitiva, tal como se describe más adelante, reveló que las dos proteínas tenían valores CI50 comparables con respecto a la unión a anticuerpos Jo-1 (datos no mostrados). La formación reducida espectacularmente de enlaces de disulfuro entre cadenas asociadas con HRS(1-506) sugiere que esta variante es un punto de partida adecuado para el desarrollo de una próxima generación mejorada de formas de productos.

20

Para determinar si alguno de los cuatro residuos de cisteína restantes expuestos parcialmente en HRS de longitud completa podría mutarse en residuos de aminoácidos de origen natural alternativos, se diseñaron cebadores para mutar selectivamente los residuos C174, C191, C224 y C235. Para lograrlo, se usaron los cebadores siguientes recogidos en la **Tabla E6**.

25

Tabla E6			
Mutación	Secuencia oligo	SEQ NO:	ID
C191A	CCCGGATGCCGAGGCTTTGAAAATTATGTG (Directa)	221	
C191A	CAC ATA ATT TTC AAA GCC TCG GCA TCC GGG (Inversa)	222	
C191S	GATCCCGGATGCCGAGAGTTTGAAAATTATGTGTG (Directa)	223	
C191S	CAC ACA TAA TTT TCA AAC TCT CGG CAT CCG GGA TC (Inversa)	224	
C191V	GATCCCGGATGCCGAGGTTTGAAAATTATGTGTG (Directa)	225	
C191V	CAC ACA TAA TTT TCA AAA CCT CGG CAT CCG GGA TC (Inversa)	226	
C174A	CGCGAATTCTATCAGGCTGATTTTGATATTGCCGG (Directa)	227	
C174A	CCG GCA ATA TCA AAA TCA GCC TGA TAG AAT TCG CG (Inversa)	228	
C174V	CGCGAATTCTATCAGGTTGATTTTGATATTGCCGG (Directa)	229	
C174V	CGG CAA TAT CAA AAT CAA CCT GAT AGA ATT CGC G (Inversa)	230	
C224S	GGTATGTTTGCTATTTCCGGTGTTTCTGATTCC (Directa)	231	
C224S	GGA ATC AGA AAC ACC GGA AAT AGC AAA CAT ACC (Inversa)	232	
C235S	CCAAATTCGTACAATCTCCTCAAGCGTGGACAAATTGG (Directa)	233	
C235S	CCA ATT TGT CCA CGC TTG AGG AGA TTG TAC GGA ATT TGG (Inversa)	234	
C191A	CCCGGATGCCGAGGCTTTGAAAATTATGTG (Directa)	235	
C191A	CAC ATA ATT TTC AAA GCC TCG GCA TCC GGG (Inversa)	236	

- Se introdujeron mutaciones por mutagenia usando el kit de mutagenia dirigida al sitio QuikChange Lightning (Agilent, nº cat. 210518) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la mutagenia, las muestras se trataron con enzima Dpn I a 37°C y se transformaron en células competentes de oro XL10 usando procedimientos rutinarios.
- Se cultivaron múltiples colonias en caldo Terrific durante toda la noche a 37°C y los plásmidos resultantes se purificaron con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen nº cat. 27106). Los plásmidos se secuenciaron para confirmar la identidad de la sustitución de aminoácidos de cada clon. Los clones representativos se transformaron en células competentes NovaBlue (Novagen nº cat. 70181) y se cultivaron en 250 ml de medio M9YE a 37°C durante toda la noche. Se realizaron preparaciones máximas con el kit HiSpeed Plasmid Maxi (Qiagen nº cat. 12663) para crear una reserva de plásmidos de mutantes para su posterior análisis. La concentración y la pureza se determinaron midiendo A260, A280 y A230. Los plásmidos purificados se almacenaron a -20°C antes de la transfección en células de E. coli o de mamífero según protocolos estándar.
- Para valorar el impacto de la mutación de cada residuo, se transformaron clones representativos en células de E. coli o de mamífero, y el rendimiento de producción, el contenido de endotoxinas, la estabilidad y la actividad relativa se midieron en un ensayo ELISA para determinar la unión de anticuerpos Jo-1 tal como se describe más adelante.

- Producción de proteínas.** Se transformaron células competentes BL21 (DE3) (Novagen, nº cat. 69450) o W3110 (ATTC) con la construcción de expresión con optimizaciones de codones que codifican las construcciones de cisteína reducidas tal como se describe anteriormente. El sistema de expresión, los medios de fermentación, las condiciones de fermentación y las etapas de purificación utilizados para producir proteínas recombinantes fueron esencialmente los mismos que los descritos en el Ejemplo 6 mostrado a continuación, después de ajustar la escala de producción y la cantidad de pasta celular usada. La **Tabla E7** mostrada a continuación contiene los rendimientos de purificación y los niveles de endotoxinas para las proteínas preparadas.

Tabla E7		
Rendimientos de purificación y niveles de endotoxinas de variantes de cisteína reducidas		
Nombre	Rendimiento (mg/g pasta celular)	Endotoxina (UE/mg)
HRS de longitud completa	++	3,2
HRS(1-506)	+++	0,32
HRS(1-506)C174V	++	0,71
HRS(1-506)C174A	++	0,30
HRS(1-506)C191A	++	0,46
HRS(1-506)C191V	+++	0,33
HRS(1-506)C191S	+++	0,32
HRS(1-506)C224S	++	0,54
HRS(1-506)C235S	+++	0,60

+++ más de 7 mg de proteínas/g de pasta celular;
++ más de 5 mg/g de pasta celular
+ menos de 5 mg/g de pasta celular.

Los resultados muestran que todas las variantes Cys reducidas estaban relativamente bien expresadas, y se purificaron con éxito con bajos niveles de endotoxinas. En particular las variantes de cisteína reducidas basadas en la mutación de Cys191 y Cys235 mostraron niveles de expresión favorables; aunque todos los clones mostraron niveles de expresión razonables y bajos niveles de endotoxinas. En comparación con la expresión de HRS de longitud completa, todas las proteínas modificadas de cisteína mostraron un contenido de endotoxinas significativamente menor. Por otra parte, todos los mutantes de cisteína reducidos HRS(1-506), HRS(1-506)C191V, HRS(1-506)C191S y HRS(1-506)C235S mostraron una expresión mejorada con respecto HARS de tipo no mutado de longitud completa.

Para evaluar el impacto de las mutaciones de cisteína en la heterogeneidad de carga de las proteínas purificadas, las muestras de cada clon se analizaron por enfoque isoeléctrico. Las muestras (10 µg) se cargaron en un gel de enfoque isoeléctrico (pH 3-10) usando un gel IEF de Life Technologies Novex de pH 3-10 de 1,0 mm (nº cat. P/N EC6645BOX), marcador IEF Novex 3-10 (nº cat. P/N 391201), kit de tampón IEF Novex pH 3-10 (nº cat. P/N LC5317), se hicieron pasar con tampón de cátodo 1X (cámara superior) y tampón de ánodo 1X (cámara inferior) a 100 V durante 1 hora, 200 V durante 1 hora y 500 V durante 30 minutos. Los geles se fijaron con TCA al 12% con ácido sulfosalicílico al 3,5% durante 30 minutos y se tiñeron con Expedeon InstantBlue (nº cat. P/N ISB1L). Los datos (resultados no mostrados) revelan que la mutación de la cisteína en la posición 174 redujo significativamente la heterogeneidad de punto isoeléctrico, consistente con la posibilidad de que este residuo de cisteína experimente una formación de enlace de disulfuro intramolecular con cisteína 191.

Para valorar el impacto de las modificaciones de cisteína en la estabilidad térmica, la propensión a la agregación, la estructura y la actividad de tRNA sintetasa de las proteínas resultantes, se valoraron las proteínas por fluorimetría de barrido diferencial, HPLC de reducción de tamaño (SE-HPLC), ELISA competitiva y titulación de sitios activos. Los resultados se muestran en la **Tabla E8** más adelante.

Se realizó fluorimetría de barrido diferencial en muestras de proteínas mediante supervisión de la fluorescencia en función de la intensidad de fluorescencia de un colorante lipófilo durante desnaturalización térmica. Los estudios se realizaron en muestras después de ser diluidos a 0,5 mg/mL en un volumen final de 100 µL de PBS pH 7,0 (NaCl 150 mM, fosfato 20 mM) y mezclados con una solución de colorante de desplazamiento térmico, que se preparó diluyendo la solución de reserva (Applied Biosystems/Life Technologies, P/N 4461146) 20 veces en agua destilada ultrapura (Gibco, P/N 10977). Se añadieron 5 µL del colorante diluido a 100 µL de muestra. La mezcla se sembró en una placa de reacción óptica transparente de 384 pocillos (Applied Biosystems/Life Technologies P/N 4309849) en 20 µL cada pocillo y replicados de 4 pocillos por muestra. La placa se leyó mediante ViiA 7 Real Time PCR Instrument (Applied Biosystems/Life Technologies, P/N 4453552). El protocolo de desnaturalización térmica comenzó con un cambio de velocidad de 1,6°C/s, hasta que se alcanzó una temperatura de 25°C, punto en el cual el instrumento se mantuvo a esta temperatura durante 2 minutos, antes de aumentar adicionalmente la temperatura a 99°C, a una velocidad de 0,5°C/s punto en el cual se mantuvo esta temperatura durante 2 minutos más.

El análisis de HPLC de exclusión de tamaños se completó en las muestras de proteína purificada usando TSKgel Super SW3000, DI 4,6 mm x 30 cm, tamaño de partícula 4 µm, columna 250 Å (Tosoh, 18675) usando una fase móvil de fosfato de Na 200 mM, NaCl 150 mM pH 7,0, a una velocidad de flujo de 0,3 mL/min, con un sistema HPLC Agilent 1260 equipado con un desgasificador de vacío, bomba binaria/cuaternalia, muestreador automático con termostato, compartimento de columna con termostato, detector de matriz de diodos (DAD) y software de cromatografía Chemstation). Se inyectaron muestras no diluidas (40 µg) de cada proteína después de una breve centrifugación. Se usó una muestra de adecuación del sistema (albúmina de suero bovino, BSA, Thermo Scientific, P/N: 23209) y un control interno (HRS de tipo no mutado) para encuadrar las muestras y garantizar la validez de la prueba.

Se realizaron pruebas ELISA competitivas en placas de 96 pocillos (Immulon 4HBX) que se habían recubierto con una solución de 50 µL de HARS con etiqueta His de longitud completa, ajustada a una concentración de 2 µg/mL con PBS. Se sellaron las placas y se incubó durante toda la noche a 4°C. Antes de usar, se lavaron las placas cinco veces con PBST y posteriormente se bloquearon con 100 µL de BSA al 1% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Mientras las placas ELISA estaban bloqueadas, se incubaron las moléculas de competencia de cisteína reducida (en un intervalo de concentración de 1×10^{-6} M a 1×10^{-13} M) con anticuerpos α-Jo-1 (GenWay GWB-FB7A3D o Immunovision HJO-0100) a dilución 1:10.000 en BSA al 1% PBS en una placa de incubación separada (Costar 3357 96 pocillos) durante una hora a 4°C. Después de finalizar el bloqueo, se lavaron las placas ELISA tres veces con PBST y se añadieron 50 µL de solución que contenía anticuerpo y competidor a la placa ELISA y se

incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Después de la incubación de unión inicial, se lavaron las placas cinco veces con PBST. A continuación se añadieron, 50 µL de anticuerpo de detección (IgG F(ab')₂:HRP antihumana de cabra AbD Serotec 0500-0099) a una dilución 1:5.000 y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación de unión secundaria, se lavaron las placas con cinco veces PBST y se añadieron 50 µL de sustrato TMB (Thermo Scientific Pierce TMB Substrate PI-34021). Las reacciones prosiguieron durante 8 minutos hasta el momento en que se añadieron 50 µL de solución de detención de ácido sulfúrico 2 M. Se realizó cuantificación colorimétrica con un lector de placas SpectraMax a 450 nM.

Para determinar el número de sitios activos catalíticos en cada variante de cisteína HARS506 se empleó el ensayo de valoración de sitios activos (tal como se describe en Fersht y col., (1975) Biochemistry). Brevemente, los ensayos se realizaron a temperatura ambiente con HARS 5 µM, MgCl₂ 10 mM, ATP 50 µM, L-histidina 20 mM, 2 µg/mL de pirofosfatasa inorgánica, [γ-³²P]ATP 1,65 µM en tampón estándar (HEPES 100 mM pH 7,5, KCl 20 mM). Las reacciones se iniciaron con enzima en placas PCR de bajo perfil y se inactivaron los puntos temporales en placas de filtro MultiScreen PVDF de 96 pocillos Millipore que contenían suspensión de HClO₄/carbón (suspensión 1:4 de HClO₄ al 7%:carbón al 10%) a 30 s, 1 min, 2 min, 4 min, 6 min y 10 min. Después de mezclado y pipeteo se agitaron las muestras en una placa de recogida con centelleo Supermix, y se contaron con un lector de placas Microbetae.

Tabla E8					
Efecto de modificación de cisteínas en la estabilidad térmica, la agregación y la actividad de HARS					
Nombre	Tf	% Agregados de peso molecular bajo	% Agregados de peso molecular alto	CI50 por ensayo ELISA	Valoración de sitios activos
HRS de longitud completa		1,2	7,0	0,2	ND
HRS(1-506)	49,0	2,0	0,2	0,15	63,3
HRS(1-506)C174V	47,8	7,8	0,4	0,39	55,5
HRS(1-506)C174A	49,2	3,0	0,8	0,19	59,8
HRS(1-506)C191A	44,7	5,1	0,3	0,14	66,2
HRS(1-506)C191V	47,8	1,8	0,2	0,16	60,8
HRS(1-506)C191S	45,8	2,3	0,3	0,16	63,2
HRS(1-506)C224S	48,9	4,9	0,5	0,14	60,5
HRS(1-506)C235S	48,8	3,1	0,42	0,14	64,6

Los resultados de estos estudios confirman que todos los mutantes de cisteína están activos, con pérdida escasa o nula de actividad, estabilidad o conformación tal como se mide por valoración de sitios activos, unión ELISA y determinaciones de Tf para desnaturalización térmica. La valoración de sitios activos de la actividad de tRNA sintetasa reveló que todos los mutantes de cisteína reducida están activos, y así son adecuados para su uso en cualquiera de las composiciones, procedimientos y kits descritos en la presente memoria. En general las sustituciones Cys191 mostraron menor termoestabilidad global, mientras que los mutantes Cys174 mostraron una heterogeneidad significativamente menor determinada por enfoque isoeléctrico.

EJEMPLO 6

CREACIÓN DE POLIPÉPTIDOS DE HRS MODIFICADOS CON UN TRUNCAMIENTO EN EL EXTREMO C (HisRS^{N8})

Para suprimir los tres últimos aminoácidos y el conector entre HisRS de tipo no mutado y la etiqueta His, se diseñaron cebadores para su uso con el kit de mutagenia dirigida al sitio QuikChange Lightning (Agilent, nº cat. 210519). Para conseguirlo, se usan los cebadores siguientes recogidos en la **Tabla E9**:

Tabla E9			
Mutación		Secuencia oligo	SEQ ID NO:
Suprimir Para	CICAAALE	5'-CGCCGCACCGGTCAACCGTTACACCACCACCACCACCTG-3'	66
Suprimir Rev	CICAAALE	5'-CAG TGG TGG TGG TGG TGT AAC GGT TGA CCG GTG CCG CG -3'	67

La delección se realizó mediante las instrucciones del fabricante del kit de mutagenia dirigida al sitio QuikChange Lightning. Después de la mutagenia, la muestra se trató con enzima Dpn I a 37°C y se transformó en células competentes de oro XL10 usando procedimientos rutinarios. Se cultivaron múltiples colonias en caldo de Luria-Bertani durante toda la noche a 37°C y los plásmidos resultantes se purificaron con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen nº cat. 27106). Se secuenciaron los plásmidos para confirmar la identidad de la sustitución de aminoácidos de cada clon. Para suprimir la etiqueta His, se diseñaron cebadores para su uso con el kit de mutagenia dirigida al sitio QuikChange Lightning (Agilent, nº cat. 210519). Para conseguirlo, se usaron los siguientes cebadores recogidos en la **Tabla E10**:

Tabla E10			
Mutación		Secuencia oligo	SEQ ID NO:
Suprimir His-tag Para		5'-CGC CGC ACC GGT CAA CCG TTA TGA GAT CCG GCT GCT AAC -3'	68
Suprimir His-tag Rev		5'-GTT AGC AGC CGG ATC TCA TAA CGG TTG ACC GGT GCG GCG -3'	69

La delección se realizó mediante las instrucciones del fabricante del kit de mutagenia dirigida al sitio QuikChange Lightning, tal como se describe anteriormente.

Producción de proteínas. Se transformaron células competentes BL21 (DE3) (Novagen, nº cat. 69450) o células W3110 (ATTC) con la construcción de expresión con optimización de codones que codifica HisRS^{N8} (HRS(1-506)) tal como se describe en el Ejemplo 2. El sistema de expresión, los medios de fermentación y las condiciones de fermentación usadas para producir proteína recombinante fueron esencialmente los mismos que se describen en el Ejemplo 2.

Purificación de HisRS^{N8} sin etiqueta (HisRS(1-506)). Se resuspendió pasta celular congelada (400 g) en 4 volúmenes (1.600 mL) de tampón de lisis (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, L-cisteína 2 mM, pH 7,4). Se añadieron comprimidos de inhibidores de proteasa EDTA-FREE completa (Roche, cat. # 05 056 489 001) a la suspensión en una proporción de 1 comprimido/50 mL. Se hizo pasar la suspensión a través de un microfluidizador (Microfluidics) dos veces a 18.000 psi con enfriamiento con hielo. Se centrifugó el lisado a 15.000 x g durante 45 min a 4°C. Se filtró el sobrenadante a través de 2-3 cápsulas AcroPak 1500 (0,8/0,2 µm, Pall, PN12675).

Se cargó el lisado aclarado en una columna HP Q de 382 ml (5 x 19,5 cm), preequilibrado con tampón A Q (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4). Se eluyó el producto con un gradiente lineal de Tampón B Q al 0-30% (Tris 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,4) sobre 10 volúmenes de columna (CV). Se recogieron las fracciones a ½ CV/fracción y se analizó mediante SDS-PAGE. Las reservas se basaron en análisis de gel.

Se añadió una solución de sulfato de amonio 3,5 M a la reserva HP Q sobre una concentración final de 1,2 M. Se filtró la mezcla a través de un AcroPak 200 (0,2 µm) y se cargó en una columna HP de fenilo de 481 ml (5 x 24,5 cm) preequilibrada con Tris 20 mM, sulfato de amonio 1,2 M, pH 7,0. Se eluyó el producto con un gradiente lineal de sulfato de amonio 1,2 - 0 M en Tris 20 mM/pH 7,0 sobre 10 CV. Se prepararon reservas de fracciones (½ CV/fracción) que contenían el producto basándose en análisis de SDS-PAGE.

La reserva de fenilo anterior se concentró a 0,5 L por medio de un sistema TFF, que consistía en un soporte de casete Pellicon Mini (Millipore Cat# XX42PMINI), una bomba I/P Masterflex y una casete de 2 x 0,1 m² (30 kD MWCO, Novasep Cat# PP030M01L). A continuación la solución concentrada se intercambió con tampón con 6 diavolúmenes (3 L) de tampón CHT A (fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0). Se filtró el retenido a través de un filtro Millex GP-50 de 0,2 µm (Millipore parte # SLGP 05010) antes de proseguir con la etapa siguiente.

Se cargó la solución anterior en una columna de hidroxipatita cerámica (CHT) de 380 ml (5 x 19,4 cm) preequilibrada con tampón A CHT. Se lavó la columna con tampón A seguido por Tampón B al 6% (fosfato de sodio 500 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0). Se eluyó el producto con un gradiente lineal de tampón B al 6-56% sobre 10 CV. Se

prepararon reservas con fracciones ($\frac{1}{2}$ CV/fracción) que contenían el producto basándose en el análisis de SDS-PAGE.

Usando el mismo sistema TFF, se concentró la reserva de CHT a $\sim 0,2$ L, se intercambió el tampón con 6 diavolúmenes del tampón de formulación actual (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0) y se concentró a una concentración objeto de ~ 10 mg/ml. Se filtró la solución del producto a través de un filtro Millex GP-50 de $0,2 \mu\text{m}$ (Millipore parte # SLGP 05010), y se almacenó en congelador a -80°C .

EJEMPLO 7

10

EVALUACIÓN DE POLIPÉPTIDOS DE HRS PARA UNIRSE A ANTICUERPOS ANTI-JO-1 DE MUESTRAS DE PACIENTES HUMANOS

Se recubrieron placas de 96 pocillos (Immulon 4HBX) con $50 \mu\text{L}$ de solución de proteína, se ajustó a una concentración de $2 \mu\text{g/mL}$ con PBS. Se sellaron las placas y se incubó durante toda la noche a 4°C . Antes de usar, se lavaron las placas cinco veces con PBST y posteriormente se bloquearon con $100 \mu\text{L}$ de BSA al 1% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Mientras las placas ELISA estaban bloqueadas, se incubó la molécula de competencia con anticuerpos α -Jo-1 disponibles comercialmente (GenWay GWB-FB7A3D, Immunovision HJO-0100 o RDL) en varias diluciones en BSA al 1% PBS en una placa de incubación separada (Costar 3357 96 pocillos) durante una hora a 4°C . Después de terminar el bloqueo, se lavaron las placas ELISA tres veces con PBST y $50 \mu\text{L}$ de solución que contenía anticuerpo y se añadió competidor a la placa ELISA y se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Después de la incubación de unión inicial, se lavaron las placas cinco veces con PBST. A continuación, se añadieron $50 \mu\text{L}$ de anticuerpo de detección (IgG F(ab')₂ antihumana de cabra Serotec AbD:HRP 0500-0099) a 1:5.000 dilución y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación de unión secundaria, se lavaron las placas con cinco veces PBST y se añadieron $50 \mu\text{L}$ de sustrato TMB (Thermo Scientific Pierce TMB Substrate PI-34021). Las reacciones prosiguieron durante 8 minutos hasta el punto en que se añadieron $50 \mu\text{L}$ de solución de detención de ácido sulfúrico 2 M. Se realizó cuantificación colorimétrica usando un lector de placas SpectraMax a 450 nm .

Se muestran los resultados representativos para ensayos ELISA competitivos para HisRS^{N8} (HRS1-506) en comparación con HRS de longitud completa (**Figura 5**), Resokine (HisRS^{N4}: HRS(1-60)) en comparación con HRS de longitud completa (**Figura 4**) y HRS de longitud completa incubado con suero sobre un intervalo de diluciones (**Figura 3**). Los datos muestran que HisRS^{N8} y HRS de longitud completa, pero no Resokine, son capaces de competir por la unión de anticuerpos anti-Jo-1 de muestras humanas de pacientes con miopatía inflamatoria y/o enfermedad pulmonar intersticial que tienen anticuerpos anti-Jo-1. Así HisRS^{N8} y HRS de longitud completa proporcionan una estrategia viable para competir con y bloquear la actividad de anticuerpos anti-Jo-1 de muestras clínicas humanas que tienen una enfermedad asociada con autoanticuerpos específicos para histidil-tRNA sintetasa.

Además los datos muestran sorprendentemente que Resokine (HisRS^{N4}) en estas condiciones no experimenta significativamente reacciones cruzadas con anticuerpos anti-Jo-1 y no compete significativamente hasta presentar concentraciones superiores a aproximadamente $1 \times 10^{-7} \text{ M}$, cuando la histidil-tRNA sintetasa de longitud completa está unida a la superficie de la placa. Resokine (HisRS^{N4}) puede así administrarse a los pacientes para mediar en un efecto antiinflamatorio potencialmente sin provocar una reactividad cruzada importante con los anticuerpos anti-Jo-1 circulantes.

45

Para analizar aún más esta observación se realizaron estudios adicionales de competencia usando ELISA de valoración tradicional (**Figura 6**). Los resultados muestran que cuando HisRS^{N4} o histidil-tRNA sintetasa esencialmente de longitud completa está unida a la superficie de la placa las curvas de unión de anticuerpos anti-Jo-1 son comparables en términos aproximados, lo que sugiere que la avidez u otros efectos pueden contribuir significativamente a las diferencias aparentes observadas en el ensayo ELISA competitivo.

50

EJEMPLO 8

EVALUACIÓN DE ESPECIFICIDAD DEL EPÍTOPO DEL ANTICUERPO ANTI-JO-1

55

Para evaluar la especificidad del epítipo de los anticuerpos anti-Jo-1 de una variedad de pacientes, se obtuvieron muestras de suero de RDL (California) y se cribaron mediante un enfoque ELISA de depleción para identificar la especificidad de anticuerpos relativa de las muestras.

En resumen, se prepararon placas ELISA con las muestras de proteínas con etiqueta His recogidas en la **Figura 7**, tal como se describe anteriormente, que se expresaron y purificaron en *E. coli*, tal como se describe en el Ejemplo 2.

Primero se incubaron las muestras en placas ELISA que contenían las proteínas indicadas anteriormente (véase el Ejemplo 5), y a continuación se transfirieron los sobrenadantes a una nueva placa ELISA a la que se unió la histidil-tRNA sintetasa esencialmente de longitud completa. Comparando las valoraciones de anticuerpos antes y después de la depleción es posible calcular la parte de unión a anticuerpos anti-Jo-1 que es específica para cada construcción de proteínas.

Los datos, mostrados en la **Figura 8**, revelan un amplio intervalo de especificidades de anticuerpo para la región del dominio WHEP (1-60) así como la parte restante de la proteína (dWHEP).

10 EJEMPLO 9

ELIMINACIÓN EXTRACORPÓREA DE ANTICUERPOS JO-1 CON POLIPÉPTIDOS DE HRS

Para evaluar si los polipéptidos de HRS podrían usarse para la inmunodepleción eficaz de anticuerpos anti-HRS (por ejemplo, anticuerpos anti-Jo-1) de suero del paciente, se inmovilizaron muestras de HRS(1-506) y HRS(1-60) en un soporte sólido, y a continuación se pusieron en contacto con sueros para determinar si eran capaces de inmunodepleción de las muestras de suero de anticuerpos anti-HRS. Se midieron las valoraciones de anticuerpos anti-Jo-1 antes y después de la aplicación a la columna de afinidad para valorar la capacidad de cada uno de los polipéptidos de HRS y eliminar los anticuerpos anti-Jo-1.

Inmovilización de polipéptidos de HRS y depleción de anticuerpos Jo-1. Se inmovilizaron HARS de longitud completa, HRS(1-506), HRS(1-60) y albúmina de suero bovino en gel de agarosa usando química de reticulación de N-hidroxi-succinimida (NHS) según las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad Affi-gel 10 catálogo #153-6046). Se usó una proporción de 2 mg de proteína por 1 mL de resina para conjugación. Los anticuerpos anti-Jo-1 humanos, obtenidos de un proveedor comercial (RDL, Los Angeles CA), se diluyeron a 1:1.000 y a continuación las muestras circularon a través de una columna preparada con cada uno de los conjugados de agarosa del polipéptido de HRS inmovilizado preparados tal como se describe anteriormente. Las valoraciones de anticuerpos Jo-1 se determinaron antes y después del paso a través de la columna de afinidad tal como se describe más adelante.

Valoración de anticuerpos Jo-1. Se recubrieron placas de 96 pocillos (placas Thermo scientific Immulon 4 HBX, catálogo #6484) con HisRS1 a una concentración de 2 mcg/mL en PBS durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron las placas con PBST y se bloquearon con BSA al 1% (Invitrogen, catálogo #15260) diluido en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las placas tres veces con PBST y se incubó con muestras que contenían anticuerpos Jo-1 durante 1,5 horas a 37°C. A continuación se lavaron las placas de nuevo tres veces con PBST y se incubó con anticuerpo secundario (IgG antihumana de cabra Serotec AbD, catálogo #0500-0099) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las placas de nuevo tres veces con PBST y se incubó con sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Thermo scientific, catálogo #34021) durante 5 minutos y se añadió ácido sulfúrico 2 M y se mezcló para detener la reacción. A continuación se leyeron las placas a 450 nm y se determinó la valoración de anticuerpos relativos.

Los resultados (**Figura 9**) revelaron que HARS de longitud completa y HRS(1-506) fueron eficaces para la inmunodepleción de anticuerpos Jo-1 desde las muestras de suero humano. Sorprendentemente HRS(1-506) fue capaz de eliminar hasta el 99% de los anticuerpos Jo-1 detectables, con una única pasada a través de la resina de afinidad, mientras que HARS de longitud completa fue capaz de eliminar sólo aproximadamente el 93% de los anticuerpos detectables en las mismas condiciones. En concordancia con estudios anteriores, el uso de un fragmento menor de HARS, HRS(1-60) fue capaz de depleción de sólo aproximadamente el 20% de los anticuerpos Jo-1 detectables, lo que sugiere que este polipéptido de HRS podría ser útil para la eliminación selectiva de subpoblaciones específicas de anticuerpos Jo-1 circulantes.

50 EJEMPLO 10

EVALUACIÓN DE POLIPÉPTIDOS DE HRS PARA EL TRATAMIENTO DE MIOSITIS INDUCIDA POR ESTATINAS Y RABDOMIÓLISIS

Las estatinas son inhibidores de HMG CoA reductasa que inhiben la síntesis de mevalonato, la etapa de limitación de la velocidad en la síntesis de colesterol. La terapia con estatinas se ha demostrado beneficiosa para reducir los niveles de colesterol en los pacientes. Sin embargo, los efectos secundarios y las complicaciones de la terapia con estatinas incluyen debilidad muscular, miositis y rabdomiólisis. La miopatía muscular es una complicación con varias estatinas del mercado y a menudo a los pacientes se les retira su terapia con estatinas si muestran alguno de estos síntomas. Al igual que muchas otras miopatías, las distrofias musculares y los trastornos inflamatorios de los músculos, la evolución de la enfermedad en la miopatía inducida por estatinas parece producirse como

consecuencia de una lesión química, genética o física inicial, que se inflama cada vez más como resultado de la invasión de células inmunitarias en las células de músculo dañadas.

Por consiguiente, la miopatía inducida por estatinas representa un sistema modelo de amplia aplicación para estudiar la miositis inducida por fármacos, que es aplicable directamente a otras miopatías y distrofias musculares, todas las cuales comparten un componente inflamatorio común que media en la evolución de la enfermedad promoviendo la invasión de células inmunitarias del tejido muscular dañado.

El objetivo de este estudio era evaluar la eficacia de HRS(1-506) para revertir los efectos de miositis muscular inducida por estatinas, como se indica mediante niveles alterados de enzimas circulantes, y cambios en la expresión génica de la función muscular y los marcadores inflamatorios en respuesta al tratamiento con HRS(1-506).

Para conseguirlo, se administraron a las ratas dosis diarias de 1 mg/kg de cerivastatina y a continuación se cambió a dosis cada dos días (qod) de cerivastatina. El objetivo de este régimen posológico era mantener un estado patológico sostenido en los animales, pero no hacer dicha enfermedad tan grave como para que tuviera un impacto importante en la supervivencia de las ratas. A continuación se evaluó la eficacia de un intervalo de dosis de HRS(1-506) en ratas después de que la dosificación con estatinas hubiera iniciado ya cambios mensurables en los marcadores circulantes de miositis.

20 Protocolo y métodos. En este estudio, se trató a ratas Sprague-Dawley hembras de 10 semana de vida con 1 mg/kg de cerivastatina (Sigma, nº cat. SML0005) en metilcelulosa al 0,5%, empezando en el día 1 por medio de alimentación forzada oral. Después de 7 días de administración diaria, se cambió a las ratas a una estrategia de dosis cada dos días (qod) en los días 9, 11 y 13. Se inició la administración de HRS(1-506) y vehículo en el día 6 a través de inyección intravenosa y se administraron dosis diarias a las ratas hasta el día 14 (mostrado esquemáticamente en la Figura 10A). Todas las ratas se dejaron en el día 15, 24 horas después de la última dosificación de prueba final y 48 horas después de la última administración de estatinas. Se administró HRS(1-506) en 3 dosis (0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg) en NaPO₄ 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,0 diariamente.

Para abordar el objetivo primario de este estudio, se realizaron las siguientes medidas y se consideraron los siguientes criterios de valoración del estudio: supervivencia de las ratas, peso, niveles séricos de CK circulante en los días 12 y 15, tinción hematoxilina-eosina en las muestras de isquiotibiales del día 15, ELISA con troponina-I, hemograma completo en el día 15, qPCR en muestras de isquiotibiales y niveles séricos de HARS endógeno.

35 Procedimientos qPCR. Se seccionaron los isquiotibiales de ratones de los animales y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Se preparó el tejido en grupos de 10 isquiotibiales usando el kit RNeasy Fibrous Tissue Midi de Qiagen (Catálogo #75742). Una vez que se eluyó el ARN de la columna de Qiagen, se hizo pasar en el Bioanalyzer 2100 de Agilent para probar la integridad del ARN y NanoDrop para determinar la concentración y la pureza de ARN. A continuación se almacenó el ARN a -80°C.

40 Se realizó transcripción inversa (RT) de ARN en ADNc en un formato de placa PCR de 96 pocillos en máquina de PCR Mastercycler de Eppendorf con el siguiente programa: 37°C durante 60 minutos, 95°C durante 5 minutos. Los pocillos del borde de la placa de 96 pocillos no se usaron y se llenaron con 50 µL de agua para prevenir la evaporación de los pocillos interiores. Se usaron 20 µL de ARN y 30 µL de mezcla maestra de transcripción inversa (kit Ambion TaqMan PreAmp Cells catálogo #4387299) por RT de muestra. Una vez completada la RT, la **45** etapa siguiente consistió en preamplificar los genes de interés en el ADNc de muestra. Los cebadores de los genes de interés (cebadores DELTAgene diseñados por Fluidigm) se combinaron a una concentración final de 200 nM. Usando estos cebadores, se preamplificaron los genes de interés en cada muestra. La preamplificación se realizó en reacciones de 10 µL (2,5 µL de ADNc, 7,5 µL de mezcla maestra Pre-Amp) en formato de 384 pocillos usando una máquina de PCR Applied Biosystems ViiA7 con el siguiente programa: 95°C durante 10 minutos, 14 ciclos de **50** 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 4 minutos. Después de la etapa de preamplificación, se añadió exonucleasa (New England BioLabs catálogo #M0293L) para eliminar los cebadores no incorporados de cada muestra. Esta reacción de exonucleasa se completó también en la máquina de PCR ViiA7 con el siguiente programa: 37°C durante 30 minutos, 80°C durante 15 minutos. Después de la exonucleasa, se diluyó la muestra de RT adicionalmente a 1:5 (7 µL de muestra de exonucleasa + 18 µL de tampón EDTA bajo).

55 El chip usado para realizar la qPCR en el sistema Biomark de Fluidigm fue un 96,96 Dynamic Array IFC para expresión génica. El chip se cebó primero con el controlador IFC HX según las recomendaciones del fabricante antes de cargar la muestra y los ensayos. Para preparar los ensayos destinados a su carga en un chip, se prepararon 4,4 µL de mezcla maestra de ensayo (2X Assay Loading Reagent de Fluidigm catálogo #8500736 y **60** bajo EDTA TE) en 3,6 µL de cebadores directo e inverso 20 µM para cada gen de interés en una placa de 96 pocillos. Para preparar las muestras, se añadieron 4,5 µL de mezcla maestra de muestra (2X TaqMan Gene

Expression Master Mix de Ambion, 20X ADN Binding Dye Sample Loading Reagent de Fluidigm catálogo número 100-0388 y 20X EvaGreen de Biotium catálogo #31000) a 3 mL de muestra de exonucleasa preamplificada diluida en una placa de 96 pocillos. Una vez cebado el chip, se cargaron 5 mL de muestra o ensayo preparados anteriormente en el chip. A continuación se devolvió el chip al controlador IFC para cargar las muestras en el chip.

- 5 Después de terminar la carga del chip, pudo realizarse la qPCR en el Biomark usando un programa preajustado para 96.96 Dynamic Array for Gene Expression con una curva de fusión para determinar la especificidad del cebador. La expresión génica relativa se determinó mediante el procedimiento Ct delta-delta.

- Cuantificación de HARS extracelular.** Se desarrolló un ELISA de 96 pocillos interno usando anticuerpos monoclonales anti-HARS de 2 ratones M03 (Sigma #SAB1403905, y Abnova #H00003035-M03) y M01 (Abgent #AT2317a) en un formato tipo sándwich para detectar HARS en suero de rata. Los ensayos se realizaron en placas Costar de 96 pocillos (placa de 96 pocillos Costar #3369) usando una curva estándar de siete puntos que se generó en un intervalo entre 75 a 0,1 ng/ml usando una solución de reserva de HRS(1-506); (7,5 mg/ml en NaPO₄ 20 mM, NaCl 0,15 M pH 7,0, usando 1x PBST (Tween-20 al 0,05%) como diluyente). El ratón monoclonal M01, clon 1C8 (Abgent #AT2317a) se sometió a biotinilación interna y usado como el anticuerpo de detección, y se usó el anticuerpo monoclonal del ratón M03 (Sigma #SAB1403905, lote #11238, 0,5 mg/mL y Abnova #H00003035-M03, lote #11238, 0,5 mg/mL) como un anticuerpo de captura. Se usó caseína (Thermo Scientific #37528) como un agente de bloqueo, y se usó 1x PBST (0,05% Tween-20) como un tampón de lavado. Se cuantificó la unión de anticuerpos usando estreptavidina-HRP (Invitrogen cat#434323, Lote # 816755A) usando sustrato TMB (Thermo #34021) y con ácido sulfúrico 2 M como solución de detención.

- Los ensayos ELISA se realizaron en placas de recubrimiento durante toda la noche con 0,6 a 2 µg/ml de anticuerpo M03 en 1X PBS, que a continuación se bloqueó por incubación con caseína durante una hora, y se lavó 3x con PBST. A continuación se incubaron las placas con patrones y muestras durante 1 hora, se lavó 3 x PBST y a continuación se incubó con 500 ng/ml de M01 biotinilado diluido en PBST, 1 hora, se lavó 3 x PBST, se incubó con 200 ng/ml de estreptavidina-HRP durante una hora, se lavó 3x con PBST y a continuación se añadió el sustrato TMB durante 4 minutos. Las reacciones se interrumpieron con solución de detención y lectura de absorbancia a 450 nm.

- Los resultados se cuantificaron basándose en la curva estándar basándose en los valores de absorbancia medios en bruto sin sustracción de fondo. Se usó Prism para ajuste de curva estándar. Modelo: se calculó Log(agonista) con respecto a ajuste de respuesta [regresión logística de 4 parámetros]% de recuperación para cada punto de concentración individual (no promediado) mediante:

$$\frac{(\text{medido} - \text{real}) \times 100\%}{(\text{real})}$$

- 35 **Otras lecturas.** Se pesó a las ratas diariamente. Se tomaron muestras de suero en los días 1, 8, 12 (por medio de la vena caudal) y día 15 (terminal) para su uso en análisis de enzima circulantes (Idexx) y se tomaron medidas séricas de Troponina-I en el músculo esquelético usando un kit ELISA comercial. Se realizó un análisis de orina en los días 3, 5, 8, 10, 12 y 15 antes de dosificación en ese día. Se realizaron análisis CBC en sangre aislada en el día 15 antes de sacrificar a las ratas. En el día 15, las ratas fueron sacrificadas y se colocó una parte del músculo de isquiotibiales y pulmón (no inflado) en el 10% de NBF para integración en parafina y tinción hematoxilina-eosina de las secciones (Premier Laboratory). Otra parte de músculo de isquiotibiales y pulmón se puso en -80°C para su uso en la extracción y definición de perfiles de ARN. Se aislaron también el hígado, el riñón y el corazón en el día 15 y se colocó en cinc-formalina para incrustación en parafina (TSRI Histology) para almacenamiento del tejido a largo plazo.

- Resultados.** Se produjo una supervivencia del 100% en este estudio, y todas las ratas sobrevivieron en la disminución programada en el día 15. Las ratas con administración de dosis de estatinas tuvieron pesos medios inferiores que las ratas de control sin dosis con estatinas. En el día 15, el grupo de estatinas + vehículo tuvo el peso medio de rata más pequeño de todos los grupos, mientras que el grupo con dosificación de estatinas + 3 mg/kg de HRS(1-506) tuvo el peso medio más alto de todos los animales tratados con estatinas (datos no mostrados). El análisis CBC mostró patrones globales similares de cambios entre diferentes grupos de tratamiento de animales (datos no mostrados).

- 55 Se observó un pequeño aumento en CK sérico en ratas tratadas con estatina sobre los controles no tratados en los días 12 y 15. En el día 12, las ratas que recibieron dosis de 1 mg/kg y 3 mg/kg de HRS(1-506) tuvieron medias de CK más pequeñas y estrechas en comparación con los animales tratados con Estatina + Vehículo (**Figura 11**) en concordancia con un impacto positivo de tratamiento con HRS(1-506) en miositis inducida por estatinas, también en

concordancia con un efecto positivo de HRS(1-506) en la función muscular, los niveles de troponina C en el músculo también eran reducidos en animales tratados con HRS(1-506) (**Figura 10B**). Por otra parte los niveles de HRS endógenas en suero estaban elevados en las ratas tratadas con estatina en comparación con ratas que no recibieron estatina (**Figura 12**), lo que sugiere que la liberación de HRS puede desempeñar un papel como regulador endógeno de la inflamación muscular. La tinción hematoxilina-eosina en los isquiotibiales reveló una degeneración/necrosis muscular reducida y puntuaciones de inflamación en ratas tratadas con estatina que recibieron dosis de 1 mg/kg y 3 mg/kg de HRS(1-506) en comparación con las ratas que recibieron dosis de vehículo y dosis de 0,3 mg/kg de HRS(1-506) (**Figura 13**).

- 10 Para investigar adicionalmente la base mecánica de los efectos de HRS en la miopatía inducida por estatinas, se examinaron los cambios en la expresión génica en los isquiotibiales de los animales tratados después de terminar el estudio. Se realizó el perfil de ARN en los músculos isquiotibiales aislados de las ratas en el día 15 tal como se describe anteriormente. Los resultados de estos estudios mostraron que los 13 genes que estaban elevados más de 5 veces en respuesta al tratamiento con estatinas se redujeron mediante por el tratamiento con HRS(1-506) (véase **Tabla E11**; y **Figuras 14-15**)

Tabla E11			
Gen regulado por más de 25 veces	Gen regulado por más de 10 veces	Gen regulado por más de 4 veces	Sin cambios
CD8a	MCP1	CD11a	HARS
MMP9	CD8b	CD11b	HARS2
IL6	CCR5	CD45	DARS
IL10	CD18	SDC1	GARS
		IFN-g	QARS

Descripción del perfil transcripcional de isquiotibiales de ratas tratadas con estatina: reveló que 10 genes relacionados con diabetes/síndrome metabólico (**Figura 16**) y varios genes de mantenimiento (datos no mostrados)

- 20 no se vieron influidos significativamente por el tratamiento con HRS. En cambio, el perfil transcripcional de isquiotibiales de ratas tratadas con estatina de 26 genes marcadores de células inmunitarias reveló cambios significativos en un mayor número de genes (véase **Figuras 17-19**), que incluye la inhibición dependiente de la dosis de expresión ITGAL(CD11a), CD11b, CD8a, CD8b, CD18, CCR5, y PTPPC (CD45R). Además HRS(1-506) fue efectiva en la reducción de la expresión de una serie de genes marcadores inflamatorios que incluyen IL6, MCP1, IL10 e IFN-gamma (véase **Figuras 20-21**). También se observaron cambios transcripcionales en 14 genes relacionados con adhesión, desarrollo y fibrosis (véase **Figuras 22-23**), el gen de la contractilidad muscular Neb (datos no mostrados) y en genes asociados con degeneración muscular, atrofia y miogenia (véanse **Figuras 24-25**).

- Conclusiones.** Se observó una reducción de CK, Troponina-I sérica y degeneración/necrosis de las células musculares e inflamación muscular en los animales que recibieron dosis más altas de HRS(1-506), a 1,0 mg/kg o a 3,0 mg/kg en contraste con los animales que recibieron Vehículo o una dosis baja 0,3 mg/kg de HRS(1-506). Los datos de perfiles de ARN respaldaron estos resultados al demostrar una expresión reducida de CD8a, IL-6, MCP-1 y MMP-9 en los isquiotibiales de ratas tratadas con estatina que recibieron dosis más elevadas de HRS(1-506). La regulación por aumento de estos genes se debe muy probablemente al incremento de infiltrado de células inmunitarias en tejido muscular dañado. Basándose en la identidad de los genes expresados, las células inmunitarias infiltrantes estarán formadas probablemente por uno o más de entre los siguientes tipos celulares, linfocitos T, células dendríticas, células NK y macrófagos/monocitos. Todos estos tipos celulares se han asociado con inflamación muscular, y la capacidad de los polipéptidos de HRS, que incluye HRS(1-506) para mediar en una inhibición espectacular de este flujo de células inmunitarias sugiere que los polipéptidos de HRS tales como HRS(1-506) representan potentes inmunorreguladores, que son capaces de actuar como potentes inmunomoduladores en una amplia variedad de enfermedades y trastornos inflamatorios y autoinmunitarios.

EJEMPLO 11

45 EVALUACIÓN DE POLIPÉPTIDOS DE HRS PARA EL TRATAMIENTO DE Distrofia muscular

- La distrofia muscular de Duchenne (DMD) está causada por mutaciones en el gen que codifica la distrofina, una proteína de subsarcolemma que funciona con el complejo de glucoproteínas asociado a la distrofina (DGC). Este complejo conecta el citoesqueleto intracelular con la matriz extracelular. La DGC se concentra en las líneas Z del sarcómero y confiere la transmisión de fuerza a través de la fibra muscular. La disrupción de este vínculo produce inestabilidad de membrana, que en su caso conduce a rupturas del sarcolemma. El flujo de calcio extracelular altera procesos moleculares como la contracción del músculo y activa la actividad proteolítica. Las fibras musculares afectadas se vuelven necróticas o apoptóticas, y liberan quimioatrayentes mitógenos, que inician procesos

inflamatorios. Los ciclos de degeneración y regeneración terminan por producir una degeneración muscular irreversible y la sustitución por tejido fibrótico y adiposo.

El músculo tiene el potencial de regenerarse por activación de células precursoras miogénicas no diferenciadas (células satélite), que normalmente están quiescentes y situadas entre la membrana basal y las miofibras. Tras la activación, las células satélite proliferan y se dividen asimétricamente, donde las células hijas tienen destinos celulares divergentes. Sólo una de las células hijas se diferencia, progresa al estadio de mioblasto y posteriormente se fusiona con otros mioblastos o con fibras musculares dañadas para inducir una reparación de fibras musculares. La otra célula hija permanece en un estado de proliferación o vuelve a la quiescencia. Las mutaciones genéticas responsables de DMD están también presentes en células satélite. Por ello, la capacidad de restaurar la función muscular normal queda obstruida. Un pequeño número de fibras musculares son capaces de producir distrofina funcional, debido principalmente a mutaciones secundarias en células precursoras miogénicas que restauran el marco de lectura. Sin embargo, estas llamadas fibras de reversión están en una minoría demasiado acusada para aliviar la patología de la deficiencia de distrofina. Según se cree, el agotamiento de la reserva de células satélite debido a los ciclos de degeneración y regeneración contribuye de forma fundamental a la enfermedad.

El modelo de ratón *mdx* para DMD tiene una mutación espontánea en el exón 23 del gen *Dmd*, que introduce un codón de parada prematuro. La patología del ratón *mdx* se caracteriza por fases histológicamente bien definidas con semejanza con la patología humana. El tejido muscular neonatal parece no resultar afectado. Los procesos de necrosis o apoptosis en combinación con inflamación aparecen aproximadamente a las 3 semanas de vida. Los procesos de regeneración se inician hacia la edad de 6 semanas y continúan alternándose con degeneración continua hasta las 12 semanas de vida. Los ratones *mdx* muestran un descenso en su capacidad de regeneración a una edad avanzada (>65 semanas), mientras que los procesos necróticos persisten. Dado que los procesos de degeneración son similares a los observados en la patología humana, las diferencias regeneracionales pueden consistir en una de las claves de la restauración de una función muscular apropiada.

Por consiguiente este modelo de ratón proporciona un sistema *in vivo* para probar el impacto de los polipéptidos de HRS en la degeneración, regeneración e inflamación de las células musculares en una base genética de relevancia directa con la enfermedad humana y el tratamiento de distrofias musculares.

El objetivo de este estudio era evaluar la eficacia de HRS(1-506) para revertir los efectos relacionados con la edad del defecto genético del gen de la distrofina en la pérdida progresiva de función muscular en el modelo *mdxmouse* tal como se indica por la alteración de los niveles de enzimas circulantes, y los cambios en la expresión génica de la función muscular y los marcadores inflamatorios en respuesta al tratamiento con HRS(1-506).

Para conseguirlo, se administró a grupos de 8 animales (ratones C57B/10ScSn-Dmd^{mdx}/J; seis semanas de vida al inicio del estudio) por inyección i.v. vehículo, HRS(1-506) (3 mg/kg) o un control positivo (Dexametasona) (1 mg/kg) una vez al día durante 14 días.

Protocolo y métodos. Se pesó a los ratones en los días 1, 8 y 15 del estudio. Se realizó una prueba de función muscular por colgado para evaluar la fuerza muscular en los días 1, 8 y 15. Se tomaron muestras de suero en los días 1, 8, (por la vena caudal) y en el día 15 (terminal) para su uso en el análisis de enzima circulantes (Idexx). Se realizó análisis CBC en sangre aislada en el día 15 antes de sacrificar a las ratas. En el día 15, las ratas fueron sacrificadas y se colocó una parte del músculo tibial anterior y los diafragmas en NBF al 10% para incrustación en parafina y tinción hematoxilina-eosina de las secciones (Premier Laboratory).

Resultados: No se observaron diferencias significativas en los pesos, los tiempos de colgado o los datos CBC de los animales tratados con HRS(1-506) o dexametasona (DEX) en comparación con los controles no tratados en el día 8 ó 15 del estudio (datos no mostrados). Sin embargo, se observaron reducciones en CK, AST y LDH sérico en los ratones tratados con HRS(1-506) y dexametasona en comparación con los controles de vehículo (**Figura 26**).

Los resultados muestran que con dosificación sólo durante 14 días se observaron reducciones consistentes en los niveles circulantes de una variedad de marcadores séricos de inflamación muscular, que incluye los niveles de CK, AST y LDH, lo que indica que HRS(1-506) tiene eficacia terapéutica en el modelo *mdxmouse* de distrofia muscular de Duchenne (DMD).

EJEMPLO 12

EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE ANTICUERPOS PARA HRS EN EL DESARROLLO DE DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURA Y MIEMBROS

- La distrofia muscular de cintura y miembros tipo 2B (DMCM2B) es causada por la pérdida de mutaciones de función en el gen de disferlina. La disferlina se expresa principalmente en el músculo esquelético y cardíaco, pero también en monocitos, macrófagos y otros tejidos donde está localizado en vesículas citoplásmicas y en la membrana celular. La disferlina parece estar relacionada con la fusión y el tráfico de membrana, así como en los procesos de reparación. DMCM2B es una enfermedad muscular de inicio tardío (adolescentes/adultos jóvenes) que se caracteriza por debilidad muscular simétrica progresiva, y notablemente por patología inmunitaria/inflamatoria agresiva. Las biopsias musculares muestran normalmente un acusado infiltrado de células inflamatorias, que consiste principalmente en macrófagos/marcadores de activación de macrófagos (HLA-DR, HLA-ABC, CD86), linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y linfocitos T CD4⁺, junto con degeneración/regeneración de la fibra muscular.
- Los ratones SJL/J tienen una delección en marco de 171 pb en la unión 3' de splicing del exón 45 de la disferlina. Desarrollan miopatía espontánea que se asocia con una inflamación muscular evidente conforme envejecen. En conjunto, estas características hacen de los ratones SJL/J un homólogo genético de miopatías deficientes en disferlina humana. Los cambios inflamatorios en los músculos de los ratones SJL/J comienzan normalmente hacia las 4-6 semanas de vida, y se caracterizan por infiltrado de macrófagos activados, seguido por linfocitos T CD4⁺. A los 6 meses, el infiltrado consiste principalmente en macrófagos, junto con cierta necrosis de las fibras musculares. A los 16 meses, las fibras musculares degeneran completamente y son sustituidas por grasa y colágeno.
- Aunque las características bioquímicas e histológicas de la cepa SJL/J se han documentado relativamente bien, la causa funcional de la miopatía en evolución no se ha caracterizado totalmente, en particular durante las primeras fases de enfermedad, que muy probablemente serán de utilidad para la evaluación de las posibles estrategias de tratamiento. Para evaluar directamente el papel potencial de los polipéptidos de HRS endógenos en la regulación de los procesos inflamatorios en curso en la cepa SJL/J, los ratones fueron inmunizados con HRS de longitud completa para secuestrar cualquier HRS endógena. Si el HRS estuviera implicado en la regulación de los procesos inflamatorios en el músculo, entonces este planteamiento produciría la inducción de inflamación muscular. Por consiguiente este modelo de ratón proporciona soporte adicional para un papel de los polipéptidos de HRS en la modulación de la degeneración, la regeneración y la inflamación de las células musculares en una base genética de relevancia directa con la enfermedad humana y el tratamiento de distrofias musculares.
- Para generar anticuerpos para HARS de longitud completa, se inmunizaron ratones SJL/J con una inmunización subcutánea con adyuvante de Freund completo (CFA) en el Día 1 y se proporcionó un refuerzo de antígeno con IFA en los días 15 y 29 para estimular aún más la producción de anticuerpos.

Protocolo y métodos. Se inmunizó a grupos de 8 animales ratones SLJ/J macho (JAX labs); (ocho semanas de vida al comienzo del estudio) con 0,2 mg de HRS de ratón (mHRS) de longitud completa por medio de administración subcutánea, con adyuvante de Freund completo en los días 1, 15 y 29. El suero se aisló en los Días 10, 25 y 43 para determinar la producción de anticuerpos. Se sacrificó a los ratones en el Día 43 y se recogieron los isquiotibiales y los pulmones (los pulmones se inflaron) para histología (tinción hematoxilina-eosina de las secciones (Premier Laboratory). Se examinaron los niveles de enzimas circulantes en suero aislados en el Día 43 (Idexx).

Resultados: Los ratones SJL/J inmunizados con mHisRS subcutáneamente generaron una robusta respuesta a los anticuerpos para HisRS de longitud completa (**Figura 27A**). No se observaron cambios significativos en los niveles de enzimas circulantes en los ratones inmunizados en comparación con los controles de vehículo, aunque los niveles de aCK estaban ligeramente elevados en el grupo inmunizado con HRS (datos no mostrados). Sin embargo, el tejido muscular de los ratones inmunizados con HisRS mostró claramente algunas regiones de infiltrado celular y miositis (**Figura 27B**), y de acuerdo con esta histopatología, dos ratones inmunizados mostraron signos de miositis.

EJEMPLO 13

DESARROLLO DE FORMULACIÓN ESTABILIZADA PARA POLIPÉPTIDOS DE HRS

Para determinar las condiciones óptimas del tampón para almacenar los polipéptidos de HRS se usó un planteamiento por etapas para optimizar las condiciones de formulación básicas. Estos estudios implicaban la determinación del intervalo de pH óptimo, el tampón de estabilización preferido y el excipiente o excipientes para mantener la estabilidad y la solubilidad de proteínas.

Los estudios se realizaron con proteínas almacenadas en el "tampón de control" (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0) a una concentración de 2 mg/ml. Se prepararon soluciones de reserva de trabajo de HRS(1-506) diluyendo la concentración de proteínas de reserva (12,5 mg/ml almacenados a -80°C) a una concentración de 2 mg/ml en los tampones respectivos hasta un volumen final de 9,1 ml. A continuación se analizaron las proteínas diluidas frente a 2 L de tampón deseado durante toda la noche con 10 kDa MWCO Slide-A-Lyzers (Thermo Fisher) a

2-8°C (P/N: 66810), y a continuación se dializaron en 2 L de tampón nuevo durante 4 horas al día siguiente.

Después de la diálisis, se probaron las muestras para determinar los valores de tiempo cero de los parámetros medidos y se distribuyeron en tubos de poliestireno de 5 ml (BD Falcon, #352859) a un volumen de 1 ml/condición.

- 5 Se taparon los tubos y se envolvieron las tapas con Parafilm. Se realizó inspección visual antes y después de la diálisis. Los ensayos realizados para cada muestra incluyeron el aspecto, el pH, fluorimetría de barrido diferencial, turbiedad y opalescencia, análisis de HPLC de reducción de tamaño (SE-HPLC) y análisis de SDS-PAGE.

Procedimientos analíticos:

10

Aspecto: El aspecto de las proteínas se evaluó mediante examen visual en dos categorías: A) opalescencia y B) partículas. Categoría A: 1 = transparente; 2 = ligeramente opalescente; 3 = opalescente; Categoría B: 1 = sin partículas; 2 = partículas presentes; 3 = fibra(s). Los resultados se expresan como "categoría A, seguido por categoría B". Por ejemplo, un resultado de "1,1" significa solución transparente sin partículas.

15

pH: El pH de la muestra se midió usando el pH-metro Accumet Basic AB15 plus (Fisher Scientific) con una microsonda (electrodo Accumet, cat# 13-620-292). La calibración y la medida se realizaron de acuerdo con el manual de instrucciones del fabricante.

- 20 **Absorbancia:** Se midió la absorbancia a 280 nm, 340 nm y 580 nm usando el espectrofotómetro SpectraMax M2 (Molecular Devices). En cada punto temporal, se usaron 100 µL de muestras no tratadas (limpias) para lecturas A340 (turbiedad) y A580 (opalescencia). Las restantes muestras se agitaron durante 5 min a 14.000 rcf, y los sobrenadantes se diluyeron 4 veces en tampones correspondientes y se midió la absorción A280.

- 25 **Fluorimetría de barrido diferencial (DSF):** Se realizó en muestras de proteínas supervisando la fluorescencia en función de la intensidad de fluorescencia de un colorante lipófilo durante desnaturalización térmica. Se realizaron los estudios en las muestras después de lo cual se diluyeron a 0,5 mg/mL en un volumen final 100 µL de PBS pH 7,0 (NaCl 150 mM, 20 mM fosfato) y se mezclaron con una solución de colorante térmico, que se preparó diluyendo la solución de reserva (Applied Biosystems/Life Technologies, P/N 4461146) 20 veces en agua destilada ultrapura (Gibco, P/N 10977). Se añadieron 5 µL del colorante diluido a 100 µL de muestra. La mezcla se sembró en una placa de reacción óptica transparente de 384 pocillos (Applied Biosystems/Life Technologies P/N 4309849) a 20 µL cada pocillo y replicados de 4 pocillos por muestra. La placa se leyó mediante ViiA 7 Real Time PCR Instrument (Applied Biosystems/Life Technologies, P/N 4453552). El protocolo de desnaturalización térmica comenzó con una velocidad de cambio de 1,6°C/s, hasta que se alcanzó una temperatura de 25°C, punto en el cual el instrumento conservó esta temperatura durante 2 minutos, antes de aumentar adicionalmente la temperatura a 99°C, a una velocidad de 0,5°C/s punto en el cual esta temperatura se conservó durante 2 minutos más.

- 40 **HPLC de exclusión de tamaños (SE-HPLC):** El análisis se completó en las muestras de proteínas purificadas usando TSKgel Super SW3000, DI 4,6 mm x 30 cm, tamaño de partícula 4 µm, columna de 250 Å (Tosoh, 18675) usando una fase móvil de fosfato de Na 200 mM, NaCl 150 mM pH 7,0, a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min, con un sistema HPLC Agilent 1260 equipado con un degasificador de vacío, bomba binaria/cuaternaria, muestreador automático con termostato, compartimento de columna con termostato, detector de matriz de diodos (DAD) y software de cromatografía Chemstation. Se inyectaron muestras no diluidas (40 µg) de cada proteína después de una breve centrifugación. Se usaron la muestra de adecuación del sistema (albúmina de suero bovino, BSA, Thermo Scientific, P/N: 23209) y el control interno (tipo no mutado HRS) para encuadrar las muestras y garantizar la validez de la prueba.

- 50 **Análisis de SDS-PAGE:** Para valorar la fragmentación y la agregación, se hizo pasar geles SDS reducidos y no reducidos para cada punto temporal. Se cargaron 10 µg de muestras de cada proteína por vía, y se analizó usando el sistema XCell Surelock Mini-Cell (Invitrogen) usando 4-12% de geles prevertidos Bis-Tris NuPAGE, 1,5 mm x 10 pocillos (Invitrogen PN NP0335BOX) y tampón NuPAGE MES SDS (Invitrogen PN NP0002) o tampón NuPAGE MOPS SDS (Invitrogen PN NP001) según las instrucciones del fabricante. Se preparó tampón de muestra de reducción a partir de 4 x reserva (Tris 0,25 M, SDS 8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,008%, βME 20% 14,3 M); el tampón de muestra de no reducción se preparó sin mercaptoetanol. Se obtuvieron marcadores de peso molecular preteñidos de Invitrogen (véase Blue Plus2, Invitrogen PN LC5925). Los geles se tiñeron con InstantBlue (Expedeon PN ISB1L) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 60 **Estudios preliminares sobre los efectos de pH e histidina en la estabilidad térmica.** Se realizaron estudios de estabilidad exploratorios usando 6x HARS de longitud completa con etiqueta His y 6x HRS(1-506) con etiqueta His. Se dializó la proteína de longitud completa en tampón de fosfato de sodio 20 mM al pH indicado (pH 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 ó 7,5) por diálisis durante toda la noche en tampones al pH respectivo. Los resultados del análisis DSF mostraron

- que existen dos transiciones térmicas para HRS cuando se incubaba a pH 7-7,5. La primera transición tuvo lugar a 48°C como indica la flecha en la **Figura 28A**, y la transición principal en este intervalo de pH tuvo lugar aproximadamente a 54°C. Las temperaturas de transición principales para cada condición de incubación de pH se resumen en la **Tabla E12**. Los análisis SE-HPLC revelaron niveles comparables de picos de peso molecular alto (APM) para las muestras almacenadas a pH 6,5-7,5, y contenidos de APM significativamente superiores con muestras almacenadas aproximadamente a pH 5,5 (datos no mostrados). También se observó precipitación con la muestra almacenada a tampón a pH 5,5 y esta muestra no se evaluó adicionalmente.

Tabla E12	
Temperaturas de transición térmica principales para HARS de longitud completa	
pH	T _f
7,5	54,2
7,0	54,2
6,5	52,9
6,0	47,7
5,5	n.d

- 10 Los resultados de estos estudios preliminares sugerían por tanto el pH óptimo estaba en el intervalo de aproximadamente 6,5 a pH 7,5, y se realizaron estudios más detallados dentro de este intervalo de pH, como se expone en detalle más adelante.

- Para determinar si la adición de histidina exógena podría tener un impacto en la estabilidad de HARS, se realizaron estudios previos de estabilidad sobre un intervalo de histidina concentraciones en el intervalo de 0,1 a 50 mM. Los resultados para los experimentos en el intervalo de 0,5 a 10 mM de histidina se muestran en la **Figura 28B**, y el efecto de un intervalo más amplio de concentraciones se muestra en la **Tabla E13**.

Tabla E13	
Impacto de la histidina en la estabilidad térmica de HRS(1-506)	
Concentración de His (mM)	T_f
Intervalo bajo (0,01 a 0,5 mM)	
0	48,03
0,01	48,03
0,03	48,21
0,05	48,38
0,08	49,08
0,1	49,08
0,2	49,96
0,3	50,31
0,4	50,83
0,5	51
Intervalo alto (0,5 a 50 mM)	
0	48,03
0,5	52,23
1	53,81
2	54,68
3	55,73
5	56,26
10	57,49
50	56,94

- 20 Los resultados de estos experimentos revelan que la adición de histidina exógena es eficaz en una amplia gama de concentraciones para estabilizar la estructura de polipéptidos de HRS. Este efecto es visible a una concentración de histidina de apenas 0,03 mM, y empieza a alcanzar su máximo a las concentraciones de 5 mM aproximadamente y superiores. Por consiguiente las concentraciones de histidina en el intervalo de aproximadamente 0,03 mM a 50 mM son eficaces para estabilizar los polipéptidos de HRS, y las concentraciones de histidina en el intervalo de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM proporcionan una estabilización térmica significativamente mejorada de los polipéptidos de HRS.

Caracterización detallada de la influencia del pH en la estabilidad de los polipéptidos de HRS. El impacto del

pH en la estabilidad de HRS(1-506) se evaluó en una amplia variedad de condiciones de incubación, y con caracterización analítica más detallada en el intervalo de pH 6,0 a 7,5. Estos estudios se realizaron usando los procedimientos analíticos descritos anteriormente, y con muestras incubadas a 5°C, temperatura ambiente y 37°C durante hasta una semana. Los resultados de estos estudios se resumen en la **Tabla E14**.

5

Tabla E14								
Evaluación de pH óptimo								
Condiciones de tampón	Aspecto	Absorbancia			Concentración	SE-HPLC		
		A340	A580	A280	(mg/ml)	%APM	%principal	%PMB
Fosfato de Na 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0								
T cero	1,1	0	-0,001	0,338	2,1	0,3	97,0	2,7
3 horas 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
3 días 37°C		++	ND	ND	ND	0	ND	ND
Fosfato de Na 50 nM, pH 7,5								
T cero	1,1	0	-0,008	0,313	2,0	0,3	96,9	2,8
3 horas 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
7 días TA		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	++	ND	ND
3 días 37°C		++++	ND	ND	ND	0	ND	ND
Fosfato de Na 50 nM, pH 7,0								
T cero	1,1	+	0,069	0,343	2,2	0,7	96,3	3,0
3 horas 5°C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas TA		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 días TA		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días TA		+	ND	ND	ND	+	ND	ND
3 horas 37°C		+	ND	ND	ND	+	ND	ND
3 días 37°C		+++	ND	ND	ND	++	ND	ND
Fosfato de Na 50 nM, pH 6,5								
T cero	1,3	0	0,000	0,320	2,0	0,6	96,4	3,0
3 horas 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 días TA		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días TA		++	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas 37°C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 días 37°C		+++	ND	ND	ND	++++	ND	ND
Fosfato de Na 50 nM, pH 6,0								
T cero	1,1	0	0,006	0,327	2,1	0,4	96,4	3,1
3 horas 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 días TA		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días TA		+	ND	ND	ND	0	ND	ND

3 horas 37°C		++	ND	ND	ND	+	ND	ND
3 días 37°C		+++++	ND	ND	ND	+++++	ND	ND
Para A340: "+++++" = A340 > 2,0; "++++" = A340 >1,5, pero <2,0; "+++" = A340 >1,0, pero <1,5; "++" = A340 >0,5, pero <1,0; "+" = A340 >0,05, pero <0,5; y "0" = A340 <0,05								
Para % APM: "+++++" = %APM > 5,0; "++++" = %APM >4,0, pero <5,0; "+++" = %APM >3,0, pero <4,0; "++" = %APM >2,0, pero <3,0; "+" = %APM >1,0, pero <2,0; y "0" = %APM <1,0								

Los resultados en totalidad sugieren que la proteína era relativamente estable cuando se incubaba en un tampón a un pH en el intervalo de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 7,5, pero que a pH menores empiezan a aparecer posibles problemas de degradación y agregación. Basándose en las condiciones probadas y los resultados de obtenidos se concluye que el intervalo de pH óptimo para el almacenamiento de polipéptidos de HRS está en el intervalo de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente 7,5.

Caracterización detallada de la influencia de diferentes composiciones de tampón en la estabilidad de los polipéptidos de HRS. El impacto de la composición del tampón en la estabilidad de HRS(1-506) se evaluó usando tres sistemas de tampón alternativos, basándose en un tampón de fosfato, un tampón de citrato y un tampón de histidina, a tres valores de pH, 7,3, 7,0 y 6,5. Estos estudios se realizaron usando los procedimientos analíticos descritos anteriormente, y con muestras incubadas a 5°C, temperatura ambiente y 37°C durante hasta una semana, y los resultados se resumen en la **Tabla E15**.

Tabla E15								
Evaluación de tampón óptimo								
Condiciones de tampón	Aspecto	Absorbancia			Concentración (mg/ml)	SE-HPLC		
		A340	A580	A280		%APM	%principal	%PMB
Fosfato de Na 50 nM, pH 7,3								
T cero	1,1	0	- 0,008	0,292	1,8	0,3	96,4	3,3
2 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días TA		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
2 días 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días 37°C		+++	ND	ND	ND	0	ND	ND
Fosfato de Na 50 nM, pH 7,0								
T cero	1,1		0,009	0,001	0,291	1,8	0,3	96,4
2 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días 37°C		++	ND	ND	ND	0	ND	ND
Fosfato de Na 50 nM, pH 6,5								
T cero		0,009	0,001	0,290	1,8	0,5	96,0	3,5
2 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
3 horas 37°C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días 37°C		++	ND	ND	ND	0	ND	ND
Citrato 50 mM, pH 7,3								
T cero	1,1		-0,011	0,287	1,8		96,4	3,2
2 días 5°C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días 37°C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
Citrato 50 mM, pH 7,0								

T cero		-0,001	0,008	0,294	1,8	0,2	96,6	3,2
2 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días 37°C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
Citrato 50 mM, pH 6,5								
T cero		-0,001	0,010	0,287	1,8	0,3	96,6	3,1
2 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días 37°C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
L-histidina 50 mM pH 7,3								
T cero		-0,008	-0,016	0,242	1,5	0,4	96,1	3,5
2 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
L-histidina 50 mM pH 7,0								
T cero		-0,003	-0,014	0,253	1,6	0,4	96,3	3,3
2 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
L-histidina 50 mM pH 6,5								
T cero		0,327	0,080	0,269	1,7	0,4	96,4	3,2
2 días 5°C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
7 días 5°C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días TA		++	ND	ND	ND	+	ND	ND
7 días TA		++	ND	ND	ND	+	ND	ND
3 horas 37°C		++++	ND	ND	ND	0	ND	ND
2 días 37°C		+++++	ND	ND	ND	++	ND	ND
Para A340: "+++++" = A340 > 2,0; "++++" = A340 >1,5, pero <2,0; "+++" = A340>1,0, pero <1,5; "++" = A340>0,5, pero <1,0; "+" = A340>0,05, pero <0,5; y "0" = A340<0,05								
Para % APM: "+++++" = %APM > 5,0; "++++" = %APM >4,0, pero <5,0; "+++" = %APM >3,0, pero <4,0; "++" = %APM >2,0, pero <3,0; "+" = %APM >1,0, pero <2,0; y "0" = %APM <1,0								

Resultados y conclusiones: El tampón de histidina en el intervalo de aproximadamente pH 7,0 a pH 7,4 mostró el mejor funcionamiento en estos estudios. El tampón de histidina también mejoró la estabilidad de los polipéptidos de HRS en ~8°C (datos no mostrados). Los polipéptidos de HRS mostraron también buena estabilidad en tampones de citrato dentro de un amplio intervalo de valores de pH (pH 6,7-7,3).

El mayor intervalo de pH aceptables observado con los tampones de citrato en comparación con el tampón de histidinas sugiere que los tampones basados en histidina y citrato son sistemas de tampón candidatos potencialmente atractivos para evaluar adicionalmente los tampones de almacenamiento para polipéptidos de HRS.

10

Caracterización detallada de la influencia de diferentes excipientes en la estabilidad de los polipéptidos de HRS. El impacto de la composición del tampón en la estabilidad de HRS(1-506) se evaluó usando diversos excipientes potenciales que incluyen sacarosa, manitol, trehalosa, sorbitol, arginina, glicina, glicerol y sal (NaCl 280 mM). Estos estudios se realizaron usando los procedimientos analíticos descritos anteriormente, y con muestras incubadas a 5°C, temperatura ambiente y 37°C durante hasta una semana, y los resultados se resumen en las

15

Tablas E16 y E17.

Tabla E16									
Evaluación de excipientes óptimos									
		Absorbancia			Concentración	SE-HPLC			
Condiciones de tampón	Aspecto	A340	A580	A280	(mg/ml)	%APM	%principal	%PMB	Tf
L-histidina 50 mM pH 7,3									
T cero	1,1	0,024	0,010	0,300	1,9	0,8	97,2	2,0	56,94
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	++	ND	ND	
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 37°C		+	ND	ND	ND	++	ND	ND	
L-histidina 50 mM + sacarosa 280 mM pH 7,3									
T cero	1,1	0,005	-0,008	0,318	2,0	0,7	97,3	2,0	57,64
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días 5°C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días 37°C		0	ND	ND	ND	++	ND	ND	
L-histidina 50 mM + manitol 280 mM pH 7,3									
T cero		0,017	0,001	0,321	2,0	0,8	97,4	1,7	57,46
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 5°C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días TA		+	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días 37°C		+	ND	ND	ND	+	ND	ND	
L-histidina 50 mM + 280 mM Trehalosa pH 7,3									
T cero	1,1	0,013	0,000	0,342	2,2	0,8	97,5	1,7	57,64
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
L-histidina 50 mM + 280 mM Sorbitol pH 7,3									
T cero		-0,035	-0,051	0,263	1,7	0,8	97,4	1,8	57,64
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
L-histidina 50 mM + arginina 280 mM pH 7,3									
T cero		0,007	0,001	0,344	2,2	0,7	97,3	1,9	58,34
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
L-histidina 50 mM + glicina 280 mM pH 7,3									
T cero		0,037	0,022	0,333	2,1	0,8	97,3	1,8	57,29
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	

7 días 5°C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
L-histidina 50 mM + 280 mM Glicerol pH 7,3									
T cero		0,033	0,017	0,284	1,8	0,9	97,3	1,8	57,29
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	+++	ND	ND	
3 horas 37°C		+	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días 37°C		+++	ND	ND	ND	+++++	ND	ND	
L-histidina 50 mM + NaCl 280 mM pH 7,3									
T cero		0,060	0,046	0,353	2,2	0,7	97,5	1,9	59,74
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 horas 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días 37°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
Para A340: "+++++" = A340 > 2,0; "++++" = A340 > 1,5, pero < 2,0; "+++" = A340 > 1,0, pero < 1,5; "++" = A340 > 0,5, pero < 1,0; "+" = A340 > 0,05, pero < 0,5; y "0" = A340 < 0,05									
Para % APM: "+++++" = %APM > 5,0; "++++" = %APM > 4,0, pero < 5,0; "+++" = %APM > 3,0, pero < 4,0; "++" = %APM > 2,0, pero < 3,0; "+" = %APM > 1,0, pero < 2,0; y "0" = %APM < 1,0									

Estos resultados muestran mejoras significativas en la estabilidad de los polipéptidos de HRS en presencia de un tampón de histidina, en el intervalo de pH 7,0 a pH 7,5, y en presencia de cloruro de sodio, arginina, sacarosa, trehalosa, sorbitol y/o glicina. Para evaluar adicionalmente el potencial de desarrollo de formulaciones con 5 características de estabilización adicionales se evaluaron las combinaciones recogidas en la Tabla E17.

Tabla E17										
Evaluación de excipientes óptimos adicionales										
Condiciones de tampón	de	Aspecto	Absorbancia			Concentración		SE-HPLC		Tf
			A340	A580	A280	(mg/ml)	%APM	%principal	%PMB	
L-histidina 50 mM + sacarosa 280 mM+0,05% PS80 pH 7,3										
T cero		1,1	0,020	0,004	0,380	2,4	1,3	97,0	1,7	58,35
3 días 5°C			0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 5°C			0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días TA			0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días TA			0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días 37°C			+	ND	ND	ND	+++++	ND	ND	
7 días 37°C			+	ND	ND	ND	+++++	ND	ND	
5X congelación-descongelación			0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
L-histidina 50 mM + arginina 280 mM +0,05% PS80					pH 7,3					
T cero		1,1	0,010	0,001	0,361	2,3	1,1	97,2	1,7	56,08
3 días 5°C			0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 5°C			0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días TA			0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días TA			0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días 37°C			0	ND	ND	ND	++	ND	ND	
7 días 37 C			0	ND	ND	ND	++++	ND	ND	
5X congelación-descongelación			0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
L-histidina 50 mM + NaCl 280 mM+0,05% PS80 pH 7,3										
T cero			0,012	0,002	0,372	2,3	1,3	97,0	1,7	62,03

3 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
5X congelación-descongelación		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
L-histidina 50 mM + NaCl 140 mM+0,05% PS80 pH 7,3									
T cero	1,1	0,015	0,005	0,376	2,4	1,2	97,1	1,7	61,15
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 37°C		0	ND	ND	ND	++	ND	ND	
5X congelación-descongelación		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
L-histidina 50 mM + NaCl 140 mM + 2% Trehalosa + 0,05% PS80 pH 7,3									
T cero		0,009	-0,001	0,357	2,2	1,2	97,1	1,8	61,15
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
3 días 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 37°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
5X congelación-descongelación		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
L-histidina 50 mM + NaCl 140 mM + 2% de sacarosa + 0,05% PS80 pH 7,3									
T cero		0,005	-0,004	0,366	2,3	1,1	97,2	1,8	61,15
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días 37°C		+	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 37°C		+	ND	ND	ND	+++++	ND	ND	
5X congelación-descongelación		0	ND	ND	ND	+	ND	ND	
L-histidina 50 mM + NaCl 140 mM + 2% de sacarosa + 0,05% PS20 pH 7,3									
T cero		0,007	-0,001	0,385	2,4	0,1	97,9	1,9	60,98
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días 37°C		+	ND	ND	ND	+	ND	ND	
7 días 37°C		+	ND	ND	ND	+	ND	ND	
5X congelación-descongelación		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
L-histidina 50 mM + NaCl 140 mM + 2% de sacarosa + 0,1% Pluronic F68 pH 7,3									
T cero		0,015	0,008	0,352	2,2	0,2	97,9	1,9	60,10
3 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días 5°C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 horas TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días TA		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	
3 días 37°C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND	
7 días 37°C		+	ND	ND	ND	+	ND	ND	
5X congelación-descongelación		0	ND	ND	ND	0	ND	ND	

Para A340: "+++++" = A340 > 2,0; "++++" = A340 > 1,5, pero < 2,0; "+++ " = A340 > 1,0, pero < 1,5; "++" = A340 > 0,5, pero < 1,0; "+" = A340 > 0,05, pero < 0,5; y "0" = A340 < 0,05

Para % APM: "+++++" = %APM > 5,0; "++++" = %APM > 4,0, pero < 5,0; "+++ " = %APM > 3,0, pero < 4,0; "++" = %APM > 2,0, pero < 3,0; "+" = %APM > 1,0, pero < 2,0; y "0" = %APM < 1,0

Resultados: Usando estos sistemas tampón se produjeron cambios reducidos o inexistentes en la turbiedad o la formación de agregados de APM cuando las muestras se incubaron a 5°C o a temperatura ambiente. Sin embargo se observaron aumentos dependientes del tiempo en este parámetro para todas las muestras cuando se incubó a 37°C. Todas las formulaciones tuvieron un cambio muy pequeño tras 5 ciclos de congelación-descongelación.

En conjunto, las condiciones PS20 (Histidina/Sacarosa/PS20) y F68 (Histidina/Sacarosa/F68) fueron las que mejor funcionaron basándose en el análisis SE-HPLC de formación de agregados de peso molecular alto, y estos agentes fueron capaces de reducir significativamente la formación de picos de APM cuando los polipéptidos de HRS se incubaron a 37°C durante hasta 7 días

Con respecto a la formación de turbiedad (A340), la adición de arginina fue la que mejor funcionó, seguido por sal (condiciones de NaCl 280 mM y NaCl 140 mM), lo que sugiere que estos agentes reducen efectivamente o previenen la agregación y desnaturalización de los polipéptidos de HRS cuando se incuban durante periodos de tiempo extensos a 37°C. En estas condiciones, Polisorbato 80, Polisorbato 20 y Pluronic F68 también redujeron efectivamente la turbiedad y la formación de agregados APM según se determina por análisis HPLC. En estos estudios, la sacarosa y la trehalosa parecen funcionar de forma aproximadamente comparable, y los dos agentes inhibieron significativamente la desnaturalización de proteínas, y la agregación, determinado por reducción de la turbiedad y la formación de APM en una incubación extendida a 37°C.

Basándose en estos estudios, la estabilización de polipéptidos de HRS puede obtenerse fácilmente a través del uso de tampón de histidinas en un intervalo de pH de aproximadamente 7,0 a 7,5. Sorprendentemente la adición de más cloruro de sodio en el intervalo de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM proporcionó una estabilización adicional de estos tampones, que condujo a un aumento mayor en la Tf a 61°C (datos no mostrados) y redujo la desnaturalización tras una incubación extendida a 37°C. La estabilidad puede mejorarse además por medio de la adición de azúcares tales como trehalosa en el intervalo de aproximadamente el 0,2% al 5%, o sacarosa en el intervalo de aproximadamente el 0,2% al 5%. Además, la adición de tensioactivos que incluyen polisorbato 20 ó 80 o Pluronic F68 en el intervalo de aproximadamente el 0,01 al 1% mejoró aún más la estabilidad global, en particular cuando se incubaba durante periodos extensos a 37°C. Es probable conseguir mejoras adicionales en la estabilidad global de las proteínas a través de la adición de agentes reductores (agentes antioxidantes) y/o agentes de quelación, tal como se describe en la presente memoria.

Basándose en estos estudios las formulaciones de ejemplo para los polipéptidos de HRS que muestran una estabilidad mejorada incluyen tampones que comprenden uno o más de los componentes recogidos en la **Tabla E18**.

Tabla E18		
Componentes tampón de ejemplo para estabilizar polipéptidos de HRS		
Componente	Función	Intervalo de ejemplo
Histidina	Tampón de pH	2 mM a 50 mM; pH 7,0 a 7,5
Citrato	Tampón de pH	2 mM a 50 mM; pH 6,5 a 7,5
Fosfato	Tampón de pH	2 mM a 50 mM; pH 7,0 a 7,5
NaCl	Fuerza iónica	100 mM - 300 mM
trehalosa	Excipiente	0,2% a 5%
Sacarosa	Excipiente	0,2% a 5%
Arginina	Excipiente	0,2% a 5%
Polisorbato 20	Tensioactivo	0,01 a 1%
Polisorbato 20	Tensioactivo	0,01 a 1%
Pluronic F68	Tensioactivo	0,01 a 1%
Cisteína	Antioxidante	0,1 a 5 mM
Metionina	Antioxidante	0,1 a 5 mM
N-acetilcisteína	Antioxidante	0,1 a 5 mM
EDTA	Agente de quelación	0,1 a 2 mM

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> aTyr Pharma Inc.

<120> HISTIDIL-TRNA SINTETASAS PARA TRATAR ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS E INFLAMATORIAS

5 <130> ATYR-110/03WO 315789-2415

<150> US-61/725.414

<151> 2012-11-12

10 <150> US-61/655.358

<151> 2012-06-04

<150> US-61/599.802

<151> 2012-02-16

15

<160> 236

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 1

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1              5              10              15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20              25              30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35              40              45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
 50              55              60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65              70              75              80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
          85              90              95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
          100              105              110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
          115              120              125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
          130              135              140

```

ES 2 652 136 T3

Thr	Asn	Ile	Lys	Arg	Tyr	His	Ile	Ala	Lys	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Asn	145	150	155	160
Pro	Ala	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gln	Cys	Asp	Phe	165	170	175	
Asp	Ile	Ala	Gly	Asn	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu	180	185	190	
Lys	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	195	200	205	
Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	210	215	220	
Gly	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	225	230	235	240
Leu	Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu	245	250	255	
Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln	260	265	270	
Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys	275	280	285	
Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	290	295	300	
Leu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Lys	Ile	Ser	Phe	305	310	315	320
Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Val	Ile	Tyr	325	330	335	
Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Gln	Ala	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu	340	345	350	
Gly	Val	Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Arg	Tyr	Asp	Gly	Leu	Val	Gly	355	360	365	
Met	Phe	Asp	Pro	Lys	Gly	Arg	Lys	Val	Pro	Cys	Val	Gly	Leu	Ser	Ile	370	375	380	
Gly	Val	Glu	Arg	Ile	Phe	Ser	Ile	Val	Glu	Gln	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu				

ES 2 652 136 T3

385 390 395 400

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
405 410 415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
500 505

<210> 2

<211> 141

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys

10

ES 2 652 136 T3

100

105

110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met
130 135 140

<210> 3

<211> 408

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130 135 140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145 150 155 160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
165 170 175

10

Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu

ES 2 652 136 T3

[illegible]

<210> 4
<211> 113
5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 652 136 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu

<210> 5

<211> 60

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
50 55 60

10

<210> 6

<211> 270

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 652 136 T3

Met	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Val	Lys	Leu	Gln	Gly	Glu	1	5	10	15
Arg	Val	Arg	Gly	Leu	Lys	Gln	Gln	Lys	Ala	Ser	Ala	Glu	Leu	Ile	Glu	20	25	30	
Glu	Glu	Val	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Leu	Lys	Ala	Gln	Leu	Gly	Pro	Asp	35	40	45	
Glu	Ser	Lys	Gln	Lys	Phe	Val	Leu	Lys	Thr	Pro	Lys	Gly	Thr	Arg	Asp	50	55	60	
Tyr	Ser	Pro	Arg	Gln	Met	Ala	Val	Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	Val	Ile	65	70	75	80
Ile	Arg	Cys	Phe	Lys	Arg	His	Gly	Ala	Glu	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Val	85	90	95	
Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Lys	Tyr	Gly	Glu	Asp	Ser	Lys	100	105	110	
Leu	Ile	Tyr	Asp	Leu	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Arg	115	120	125	
Tyr	Asp	Leu	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Leu	130	135	140	
Thr	Asn	Ile	Lys	Arg	Tyr	His	Ile	Ala	Lys	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Asn	145	150	155	160
Pro	Ala	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gln	Cys	Asp	Phe	165	170	175	
Asp	Ile	Ala	Gly	Asn	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu	180	185	190	
Lys	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	195	200	205	
Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	210	215	220	
Gly	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	225	230	235	240
Leu	Asp	Lys	Val	Gly	Tyr	Pro	Trp	Trp	Asn	Ser	Cys	Ser	Arg	Ile	Leu	245	250	255	
Asn	Tyr	Pro	Lys	Thr	Ser	Arg	Pro	Trp	Arg	Ala	Trp	Glu	Thr	260	265	270			

ES 2 652 136 T3

<210> 7
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7

```

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

Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile
          20          25          30

Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu
          35          40          45

Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu
          50          55          60

Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg
65          70          75          80

Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg
          85          90          95

Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
          100          105
  
```

10 <210> 8
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 8

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Asp Phe Asp Ile
          50          55          60
  
```

ES 2 652 136 T3

Ala	Gly	Asn	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu	Lys	Ile	
65					70				75						80	
Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	Val	Lys	
			85						90					95		
Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	Gly	Val	
			100					105					110			
Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Asp	
		115					120					125				
Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu	Lys	Gly	
	130					135					140					
Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln	Gln	His	
145					150					155					160	
Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys	Leu	Ser	
				165					170					175		
Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	Leu	Phe	
			180					185					190			
Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Lys	Ile	Ser	Phe	Asp	Leu	
		195					200					205				
Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Val	Ile	Tyr	Glu	Ala	
	210					215					220					
Val	Leu	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Gln	Ala	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu	Gly	Val	
225					230					235					240	
Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Arg	Tyr	Asp	Gly	Leu	Val	Gly	Met	Phe	
			245						250					255		
Asp	Pro	Lys	Gly	Arg	Lys	Val	Pro	Cys	Val	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Val	
			260					265					270			
Glu	Arg	Ile	Phe	Ser	Ile	Val	Glu	Gln	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	
		275					280					285				
Lys	Ile	Arg	Thr	Thr	Glu	Thr	Gln	Val	Leu	Val	Ala	Ser	Ala	Gln	Lys	
	290					295					300					
Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Trp	Asp	Ala	

ES 2 652 136 T3

```

305                      310                      315                      320

Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn
          325                      330                      335

Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile
          340                      345                      350

Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr
          355                      360                      365

Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile
          370                      375                      380

Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
385                      390                      395

```

<210> 9
 <211> 359
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 9

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

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

Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys
65          70          75          80

Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp
          85          90          95

Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu
          100          105          110

Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser
          115          120          125

Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln

```

10

ES 2 652 136 T3

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

<210> 10

<211> 399

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 652 136 T3

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

ES 2 652 136 T3

Pro Leu Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu
245 250 255

Val Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu
260 265 270

Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu
275 280 285

Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala
290 295 300

Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu
305 310 315 320

Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro
325 330 335

Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu
340 345 350

Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu
355 360 365

Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu
370 375 380

Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
385 390 395

<210> 11

<211> 473

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

10

ES 2 652 136 T3

Tyr	Ser	Pro	Arg	Gln	Met	Ala	Val	Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	Val	Ile	65	70	75	80
Ile	Arg	Cys	Phe	Lys	Arg	His	Gly	Ala	Glu	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Val	85	90	95	
Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Lys	Tyr	Gly	Glu	Asp	Ser	Lys	100	105	110	
Leu	Ile	Tyr	Asp	Leu	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Arg	115	120	125	
Tyr	Asp	Leu	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Leu	130	135	140	
Thr	Asn	Ile	Lys	Arg	Tyr	His	Ile	Ala	Lys	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Asn	145	150	155	160
Pro	Ala	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gln	Cys	Val	Asn	165	170	175	
Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	Gly	Val	Ser	Asp	180	185	190	
Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Asp	Lys	Val	195	200	205	
Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu	Lys	Gly	Leu	Ala	210	215	220	
Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln	Gln	His	Gly	Gly	225	230	235	240
Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys	Leu	Ser	Gln	Asn	245	250	255	
Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	Leu	Phe	Glu	Tyr	260	265	270	
Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Lys	Ile	Ser	Phe	Asp	Leu	Ser	Leu	275	280	285	
Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Val	Ile	Tyr	Glu	Ala	Val	Leu	290	295	300	
Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Gln	Ala	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu	Gly	Val	Gly	Ser	305	310	315	320

ES 2 652 136 T3

Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly Met Phe Asp Pro
325 330 335

Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg
340 345 350

Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile
355 360 365

Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu
370 375 380

Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile
385 390 395 400

Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu
405 410 415

Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu
420 425 430

Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg
435 440 445

Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg
450 455 460

Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
465 470

<210> 12

<211> 469

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Glu Thr Leu Met
50 55 60

10

ES 2 652 136 T3

Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln
 65 70 75 80
 Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala
 85 90 95
 Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile
 100 105 110
 Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr
 115 120 125
 Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro
 130 135 140
 Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser
 145 150 155 160
 Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile
 165 170 175
 Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg
 180 185 190
 Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu
 195 200 205
 Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala
 210 215 220
 Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val
 225 230 235 240
 Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu
 245 250 255
 Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe
 260 265 270
 Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu
 275 280 285
 Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro
 290 295 300
 Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly
 305 310 315 320

ES 2 652 136 T3

Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys
325 330 335

Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile
340 345 350

Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu
355 360 365

Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg
370 375 380

Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu
385 390 395 400

Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu
405 410 415

Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys
420 425 430

Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp
435 440 445

Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln
450 455 460

Pro Leu Cys Ile Cys
465

<210> 13

<211> 435

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

10

ES 2 652 136 T3

Tyr	Ser	Pro	Arg	Gln	Met	Ala	Val	Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	Val	Ile	65	70	75	80
Ile	Arg	Cys	Phe	Lys	Arg	His	Gly	Ala	Glu	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Val	85	90	95	
Phe	Glu	Leu	Lys	Asp	Phe	Asp	Ile	Ala	Gly	Asn	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	100	105	110	
Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu	Lys	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	115	120	125	
Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	130	135	140	
Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	Gly	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	145	150	155	160
Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	165	170	175	
Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu	Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	180	185	190	
Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln	Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	195	200	205	
Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys	Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	210	215	220	
Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	Leu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	225	230	235	240
Asp	Asp	Lys	Ile	Ser	Phe	Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Tyr	245	250	255	
Tyr	Thr	Gly	Val	Ile	Tyr	Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Gln	260	265	270	
Ala	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu	Gly	Val	Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Arg	275	280	285	
Tyr	Asp	Gly	Leu	Val	Gly	Met	Phe	Asp	Pro	Lys	Gly	Arg	Lys	Val	Pro	290	295	300	
Cys	Val	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Val	Glu	Arg	Ile	Phe	Ser	Ile	Val	Glu				

ES 2 652 136 T3

```

305                               310                               315                               320

Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln
      325                               330                               335

Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys
      340                               345                               350

Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr
      355                               360                               365

Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala
      370                               375                               380

Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly
385                               390                               395                               400

Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg
      405                               410                               415

Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
      420                               425                               430

Cys Ile Cys
      435

```

<210> 14
 <211> 171
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1      5      10      15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
      20      25      30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
      35      40      45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Ala Leu Glu Glu
      50      55      60

Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys
65      70      75      80

Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala

```

10

ES 2 652 136 T3

85

90

95

Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn
100 105 110

Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile
115 120 125

Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr
130 135 140

Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile
145 150 155 160

Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
165 170

<210> 15

<211> 211

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln
100 105 110

Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys
115 120 125

10

Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr

ES 2 652 136 T3

130 135 140

Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala
145 150 155 160

Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly
165 170 175

Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg
180 185 190

Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
195 200 205

Cys Ile Cys
210

<210> 16

<211> 141

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
1 5 10 15

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
20 25 30

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
35 40 45

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
50 55 60

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
65 70 75 80

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

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

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
115 120 125

10 Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys

130 135 140

<210> 17

ES 2 652 136 T3

<211> 143
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 17

```

Cys Leu Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp
1          5          10          15

Phe Leu Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala
          20          25          30

Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val
          35          40          45

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

Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr
65          70          75          80

Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp
          85          90          95

Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu
          100          105          110

Lys Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile
          115          120          125

Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly
          130          135          140

```

<210> 18
10 <211> 509
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 18
15

```

Met Ala Asp Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Arg Leu Gln Gly Ala
1          5          10          15

His Val Arg Gly Leu Lys Glu Gln Lys Ala Ser Ala Glu Gln Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Thr Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Gln Asp
          35          40          45

```

ES 2 652 136 T3

Glu	Gly	Lys	Gln	Lys	Phe	Val	Leu	Lys	Thr	Pro	Lys	Gly	Thr	Arg	Asp	50	55	60
Tyr	Ser	Pro	Arg	Gln	Met	Ala	Val	Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	Val	Ile	65	70	75
Ile	Arg	Cys	Phe	Lys	Arg	His	Gly	Ala	Glu	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Val	85	90	95
Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Gly	Lys	Tyr	Gly	Glu	Asp	Ser	Lys	100	105	110
Leu	Ile	Tyr	Asp	Leu	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Arg	115	120	125
Tyr	Asp	Leu	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Leu	130	135	140
Thr	Asn	Ile	Lys	Arg	Tyr	His	Ile	Ala	Lys	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Asn	145	150	155
Pro	Ala	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gln	Cys	Asp	Phe	165	170	175
Asp	Ile	Ala	Gly	Gln	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu	180	185	190
Lys	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asn	Phe	Leu	195	200	205
Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Val	Cys	210	215	220
Gly	Val	Pro	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	225	230	235
Leu	Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu	245	250	255
Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln	260	265	270
Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys	275	280	285
Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Val	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu			

ES 2 652 136 T3

290

295

300

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

Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
325 330 335

Glu Ala Val Leu Leu Gln Met Pro Thr Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
340 345 350

Gly Val Gly Ser Ile Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
355 360 365

Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
370 375 380

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Ser
385 390 395 400

Glu Glu Lys Val Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
405 410 415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Trp Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Arg Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Ala Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Arg Arg Arg Thr Asn Gln Pro Leu Ser Thr Cys
500 505

<210> 19

<211> 509

5 <212> PRT

<213> Canis lupus familiaris

<400> 19

10

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Arg Leu Gln Gly Glu

ES 2 652 136 T3

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

ES 2 652 136 T3

Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp His Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Ile Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Glu
 275 280 285
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Ala Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Val Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Thr
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Val Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asn Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 450 455 460
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 465 470 475 480
 Val Ala Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Pro Arg Glu Asp Leu Val Glu
 485 490 495
 Glu Ile Lys Arg Arg Thr Ser Gln Pro Phe Cys Ile Cys
 500 505

<210> 20
 <211> 509
 5 <212> PRT
 <213> Bos taurus

ES 2 652 136 T3

<400> 20

```

Met  Ala  Asp  Arg  Ala  Ala  Leu  Glu  Asp  Leu  Val  Arg  Val  Gln  Gly  Glu
 1              5              10              15

Arg  Val  Arg  Gly  Leu  Lys  Gln  Gln  Lys  Ala  Ser  Ala  Glu  Gln  Ile  Glu
                20              25              30

Glu  Glu  Val  Ala  Lys  Leu  Leu  Lys  Leu  Lys  Ala  Gln  Leu  Gly  Pro  Asp
          35              40              45

Glu  Gly  Lys  Pro  Lys  Phe  Val  Leu  Lys  Thr  Pro  Lys  Gly  Thr  Arg  Asp
 50              55              60

Tyr  Ser  Pro  Arg  Gln  Met  Ala  Val  Arg  Glu  Lys  Val  Phe  Asp  Val  Ile
65              70              75              80

Ile  Ser  Cys  Phe  Lys  Arg  His  Gly  Ala  Glu  Val  Ile  Asp  Thr  Pro  Val
          85              90              95

Phe  Glu  Leu  Lys  Glu  Thr  Leu  Thr  Gly  Lys  Tyr  Gly  Glu  Asp  Ser  Lys
          100             105             110

Leu  Ile  Tyr  Asp  Leu  Lys  Asp  Gln  Gly  Gly  Glu  Leu  Leu  Ser  Leu  Arg
          115             120             125

Tyr  Asp  Leu  Thr  Val  Pro  Phe  Ala  Arg  Tyr  Leu  Ala  Met  Asn  Lys  Leu
          130             135             140

Thr  Asn  Ile  Lys  Arg  Tyr  His  Ile  Ala  Lys  Val  Tyr  Arg  Arg  Asp  Asn
145             150             155             160

Pro  Ala  Met  Thr  Arg  Gly  Arg  Tyr  Arg  Glu  Phe  Tyr  Gln  Cys  Asp  Phe
          165             170             175

Asp  Ile  Ala  Gly  Gln  Phe  Asp  Pro  Met  Leu  Pro  Asp  Ala  Glu  Cys  Leu
          180             185             190

Lys  Ile  Met  Cys  Glu  Ile  Leu  Ser  Ser  Leu  Gln  Ile  Gly  Asp  Phe  Leu
          195             200             205

Val  Lys  Val  Asn  Asp  Arg  Arg  Ile  Leu  Asp  Gly  Met  Phe  Ala  Ile  Cys
210             215             220

```

ES 2 652 136 T3

Gly Val Pro Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
 245 250 255
 Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Ala Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Pro Pro Ala Arg Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Val Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Ile Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Thr Gly Ile Pro Leu Val Ala
 450 455 460
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 465 470 475 480
 Val Ala Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
 485 490 495
 Glu Ile Lys Arg Arg Thr Ser Gln Pro Leu Cys Ile Cys
 500 505

ES 2 652 136 T3

<210> 21
 <211> 508
 <212> PRT
 5 <213> Rattus norvegicus

<400> 21

```

Met Ala Asp Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Arg Leu Gln Gly Ala
1          5          10          15

His Val Arg Gly Leu Lys Glu Gln Lys Ala Ser Ala Glu Gln Ile Glu
20          25          30

Glu Glu Val Thr Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly His Asp
35          40          45

Glu Gly Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50          55          60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65          70          75          80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85          90          95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100         105         110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115         120         125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130         135         140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145         150         155         160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
165         170         175

Asp Ile Ala Gly Gln Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
180         185         190

```

ES 2 652 136 T3

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asn Phe Gln
 195 200 205
 Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Val Cys
 210 215 220
 Gly Val Pro Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
 245 250 255
 Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Val Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Met Pro Thr Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Ile Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Lys Leu Glu Ala Ser
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Val Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Ile Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu

ES 2 652 136 T3

435

440

445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Arg Arg Arg Thr Ser Gln Pro Leu Ser Met
500 505

<210> 22

<211> 500

5 <212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 22

Met Ala Asp Glu Ala Ala Val Arg Gln Gln Ala Glu Val Val Arg Arg
1 5 10 15

Leu Lys Gln Asp Lys Ala Glu Pro Asp Glu Ile Ala Lys Glu Val Ala
20 25 30

Lys Leu Leu Glu Met Lys Ala His Leu Gly Gly Asp Glu Gly Lys His
35 40 45

Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Gly Pro Lys
50 55 60

Gln Met Ala Ile Arg Glu Arg Val Phe Ser Ala Ile Ile Ala Cys Phe
65 70 75 80

Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val Phe Glu Leu Lys
85 90 95

Glu Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys Leu Ile Tyr Asp
100 105 110

Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg Tyr Asp Leu Thr
115 120 125

Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Ile Thr Asn Ile Lys
130 135 140

Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn Pro Ala Met Thr

10

ES 2 652 136 T3

145		150		155		160
Arg Gly Arg Tyr	Arg Glu Phe Tyr	Gln Cys Asp Phe Asp	Ile Ala Gly			
	165	170	175			
Gln Phe Asp Pro Met	Ile Pro Asp	Ala Glu Cys Leu Lys	Ile Val Gln			
	180	185	190			
Glu Ile Leu Ser Asp	Leu Gln Leu Gly Asp	Phe Leu Ile Lys	Val Asn			
	195	200	205			
Asp Arg Arg Ile Leu Asp	Gly Met Phe Ala Val	Cys Gly Val Pro Asp				
	210	215	220			
Ser Lys Phe Arg Thr	Ile Cys Ser Ser Val	Asp Lys Leu Asp Lys	Met			
	225	230	235	240		
Pro Trp Glu Glu Val	Arg Asn Glu Met Val	Gly Glu Lys Gly	Leu Ser			
	245	250	255			
Pro Glu Ala Ala Asp	Arg Ile Gly Glu Tyr Val	Gln Leu His Gly Gly				
	260	265	270			
Met Asp Leu Ile Glu Gln Leu	Leu Gln Asp Pro Lys	Leu Ser Gln Asn				
	275	280	285			
Lys Leu Val Lys Glu Gly	Leu Gly Asp Met Lys	Leu Leu Phe Glu Tyr				
	290	295	300			
Leu Thr Leu Phe Gly	Ile Thr Gly Lys Ile Ser	Phe Asp Leu Ser Leu				
	305	310	315	320		
Ala Arg Gly Leu Asp	Tyr Tyr Thr Gly Val	Ile Tyr Glu Ala Val Leu				
	325	330	335			
Leu Gln Gln Asn Asp	His Gly Glu Glu Ser Val	Ser Val Gly Ser Val				
	340	345	350			
Ala Gly Gly Gly Arg Tyr	Asp Gly Leu Val Gly Met	Phe Asp Pro Lys				
	355	360	365			
Gly Arg Lys Val Pro Cys	Val Gly Ile Ser Ile Gly	Ile Glu Arg Ile				
	370	375	380			
Phe Ser Ile Leu Glu Gln	Arg Val Glu Ala Ser	Glu Glu Lys Ile Arg				
	385	390	395	400		

ES 2 652 136 T3

Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu
405 410 415

Glu Glu Arg Leu Lys Leu Ile Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys
420 425 430

Ala Glu Val Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln
435 440 445

Tyr Cys Glu Asp Thr Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Val Gly Glu Gln
450 455 460

Glu Leu Lys Asp Gly Val Val Lys Leu Arg Val Val Ala Thr Gly Glu
465 470 475 480

Glu Val Asn Ile Arg Arg Glu Ser Leu Val Glu Glu Ile Arg Arg Arg
485 490 495

Thr Asn Gln Leu
500

<210> 23

<211> 437

5 <212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 23

Met Ala Ala Leu Gly Leu Val Ser Met Arg Leu Cys Ala Gly Leu Met
1 5 10 15

Gly Arg Arg Ser Ala Val Arg Leu His Ser Leu Arg Val Cys Ser Gly
20 25 30

Met Thr Ile Ser Gln Ile Asp Glu Glu Val Ala Arg Leu Leu Gln Leu
35 40 45

Lys Ala Gln Leu Gly Gly Asp Glu Gly Lys His Val Phe Val Leu Lys
50 55 60

Thr Ala Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Asn Pro Lys Gln Met Ala Ile Arg
65 70 75 80

Glu Lys Val Phe Asn Ile Ile Ile Asn Cys Phe Lys Arg His Gly Ala
85 90 95

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

10

ES 2 652 136 T3

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

ES 2 652 136 T3

Val Ser Val Gly Ser Val Ala Gly Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val
370 375 380

Gly Met Phe Asp Pro Lys Ala Gly Lys Cys Pro Val Trp Gly Ser Ala
385 390 395 400

Leu Ala Leu Arg Gly Ser Ser Pro Ser Trp Ser Arg Arg Gln Ser Cys
405 410 415

Leu Gln Arg Arg Cys Ala Pro Leu Lys Leu Lys Cys Leu Trp Leu Gln
420 425 430

His Arg Arg Thr Phe
435

<210> 24

<211> 1527

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para HisR de tipo no mutado

<400> 24

atggcagagc	gtgcggcgct	ggaggagctg	gtgaaacttc	agggagagcg	cgtgcgaggc	60
ctcaagcagc	agaaggccag	cgccgagctg	atcgaggagg	aggtggcgaa	actcctgaaa	120
ctgaaggcac	agctgggtcc	tgatgaaagc	aaacagaaat	ttgtgctcaa	aacccccaa	180
ggcacaagag	actatagtcc	ccggcagatg	gcagttcgcg	agaaggtgtt	tgacgtaatc	240
atccgttgct	tcaagcgcca	cggtgcagaa	gtcattgata	cacctgtatt	tgaactaaag	300
gaaacactga	tgggaaagta	tggggaagac	tccaagctta	tctatgacct	gaaggaccag	360
ggcggggagc	tcctgtccct	tcgctatgac	ctcactgttc	cttttgctcg	gtatttggca	420
atgaataaac	tgaccaacat	taaacgctac	cacatagcaa	aggtatatcg	gcgggataac	480
ccagccatga	cccgtggccg	ataccgggaa	ttctaccagt	gtgattttga	cattgctggg	540
aactttgatc	ccatgatccc	tgatgcagag	tgccgaaga	tcatgtgcga	gatcctgagt	600
tcacttcaga	taggcgactt	cctgggtcaag	gtaaacgata	gacgcattct	agatgggatg	660
tttgctatct	gtggtgtttc	tgacagcaag	ttccgtacca	tctgctcctc	agtagacaag	720
ctggacaagg	tgtcctggga	agaggtgaag	aatgagatgg	tgggagagaa	gggccttgca	780
cctgaggtgg	ctgaccgcat	tggggactat	gtccagcaac	atgggtgggt	atccctggtg	840
gaacagctgc	tccaggatcc	taaactatcc	caaaacaagc	aggccttgga	gggcctggga	900
gacctgaagt	tgctctttga	gtacctgacc	ctatttggca	ttgatgacaa	aatctccttt	960
gacctgagcc	ttgctcgagg	gctggattac	tacactgggg	tgatctatga	ggcagtgctg	1020

ES 2 652 136 T3

ctacagaccc cagcccaggc aggggaagag cccctgggtg tgggcagtgt ggctgctgga	1080
ggacgctatg atgggctagt gggcatgttc gaccccaaag ggcgcaaggt gccatgtgtg	1140
gggctcagca ttgggggtgga gcggattttc tccatcgtgg aacagagact agaggctttg	1200
gaggagaaga tacggaccac ggagacacag gtgcttgtgg catctgcaca gaagaagctg	1260
ctagaggaaa gactaaagct tgtctcagaa ctgtgggatg ctgggatcaa ggctgagctg	1320
ctgtacaaga agaaccctaaa gctactgaac cagttacagt actgtgagga ggcaggcatc	1380
ccactgggtg ctatcatcgg cgagcaggaa ctcaaggatg gggcatcaa gctccgttca	1440
gtgacgagca gggaagaggt ggatgtccga agagaagacc ttgtggagga aatcaaaagg	1500
agaacaggcc agcccctctg catctgc	1527

<210> 25

<211> 423

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento en el extremo N de HisRS1

<400> 25

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt	60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa	120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa	180
ggaaccctg actattctcc tcgtcaaactg gccgtccgtg aaaaagtgtt cgacgtgatc	240
attcgtgtgct ttaaaccgca tgggtgccga gtgattgata ccccggtgtt tgagctgaaa	300
gagacactga tgggcaaata tgggtgaggac agcaaactga tttatgacct gaaagatcag	360
ggtggtgaac tgctgagtct gcgctatgat ctgacagttc cgtttgcccg ttatctggca	420
atg	423

15

<210> 26

<211> 1224

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento en el extremo N de HisRS1

25 <400> 26

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt	60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa	120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa	180

ggaacccgtg actattctcc tcgtcaaata gccgtccgtg aaaaagtgtt cgacgtgatc 240
 attcgtgct ttaaagccca tgggtccgaa gtgattgata ccccggtgtt tgagctgaaa 300
 gagacactga tgggcaaata tgggtaggac agcaaactga tttatgacct gaaagatcag 360
 ggtggtgaac tgctgagtct ggcgtatgat ctgacagttc cgtttgcccg ttatctggca 420
 atgaataaac tgaccaacat taaacgctat cacattgcta aagtctatcg ccgtgacaat 480
 cctgctatga cccgtggtcg ttatcgtgag ttctatcagt gtgacttcga tattgccggc 540
 aactttgatc cgatgatccc ggatgctgaa tgcctgaaaa tcatgtgtga gatcctgagc 600
 agtctgcaga ttggcgattt cctggtgaaa gtcaacgatc gccgtattct ggatggcatg 660
 ttccgccatct gtggtgttag cgactccaaa ttccgtacca tctgtagtag tgtggacaaa 720
 ctggataaag tgagctggga ggaggtgaaa aacgaaatgg tgggcgagaa aggtctggct 780
 cctgaagtgg ctgaccgtat tgggtgattat gtccagcagc acgggtggagt atcactgggt 840
 gagcaactgc tgcaagaccc taaactgagt cagaataaac aggccctgga gggactggga 900
 gatctgaaac tgctgttcga gtatctgacc ctgttcggta tcgatgacaa aatctccttt 960
 gacctgtcac tggctcgtgg actggactat tataccggcg tgatctatga agctgtactg 1020
 ctgcaaactc cagcacaagc aggtgaagag cctctgggtg tgggtagtgt agccgctggg 1080
 ggacgttatg atggactggt ggggatgttc gaccctaaag gccgtaaaag tccgtgtgtg 1140
 ggtctgagta tcggtgttga gcgtatcttt tccatcgtcg agcaacgtct ggaagcactg 1200
 gaggaaaaaa tccgtacgac cgaa 1224

<210> 27

<211> 339

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento en el extremo N de HisRS1

<400> 27

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt 60
 ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa 120
 ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa 180
 ggaacccgtg actattctcc tcgtcaaata gccgtccgtg aaaaagtgtt cgacgtgatc 240
 attcgtgct ttaaagccca tgggtccgaa gtgattgata ccccggtgtt tgagctgaaa 300
 gagacactga tgggcaaata tgggtaggac agcaaactg 339

15

<210> 28

<211> 180

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

ES 2 652 136 T3

<223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento en el extremo N de HisRS

<400> 28

```

5      atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt      60
      ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa      120
      ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaag      180

```

<210> 29

<211> 429

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento intermedio de HisRS1

<400> 29

```

      tgcctgaaaa tcatgtgtga gatcctgagt agtctgcaaa ttggcgactt tctggtcaaa      60
      gtgaacgata gccgtattct ggatggcatg ttccgccatct gtggtgttag cgactccaaa      120
      ttccgtacaa tctgtagcag cgtggacaaa ctggataaag tgtcctggga agaggtgaaa      180
      aacgaaatgg tgggtgaaaa aggtctggct ccggagggtt ctgaccgtat cggtgattat      240
      gttcagcagc acggcggtgt tagtctggtt gaacaactgc tgcaagacct gaaactgtct      300
      cagaacaaac aggccctgga aggactggga gatctgaaac tgctgttcga gtatctgacg      360
      ctgttcggca ttgatgacaa aatttctttc gacctgtcac tggcacgtgg actggactat      420
      tataccggt      429

```

20

<210> 30

<211> 315

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento en el extremo C de HisRS1

30 <400> 30

```

      cgtaccaccg aaaccgaagt tctggttgcc tcagctcaga aaaaactgct ggaagaacgc      60
      ctgaaactgg ttagcgaact gtgggatgct ggcattaaag ccgaactgct gtataaaaaa      120
      aaccgaaac tgctgaatca gctgcagtat tgtgaggaag cgggtattcc tctggtggcc      180
      attatcggag aacaggaact gaaagacggc gttattaaac tgcgtagcgt gacctctcgt      240
      gaagaagttg acgttcgccg tgaagatctg gtcgaggaaa tcaaactcgt taccggtcaa      300
      cctctgtgta tttgc      315

```

<210> 31

35 <211> 810

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento en el extremo N de HisRS1

<400> 31

```

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt      60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa      120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa      180
ggaaccctgt actattctcc tcgtcaaatg gccgtccgtg aaaaagtgtt cgacgtgatc      240
attcgttgct ttaaacgcca tgggtgccga gtgattgata ccccggtgtt tgagctgaaa      300
gagacactga tgggcaaata tgggtgaggac agcaaactga tctatgacct gaaagaccaa      360
ggcgggtgaac tgctgtccct gcgttatgat ctgactgtgc cgtttgcccg ttatctggcc      420
atgaataaac tgacgaacat taaacgctat cacattgcc aagtgtatcg ccgtgacaat      480
cctgctatga ctctgggacg ttatcgtgaa ttctatcagt gtgacttga tattgccggc      540
aacttcgacc ctatgattcc ggatgctgaa tgccctgaaa tcatgtgtga gatcctgagc      600
agcctgcaaa ttggtgactt cctggtgaaa gtgaatgacc gtcgtatcct ggatggcatg      660
tttgccattt gtggtgtgag cgattccaaa ttccgtacca tctgtagtag tgtggacaaa      720
ctggataaag tgggctatcc gtggtggaac tctttagacc gtattctgaa ctatcctaaa      780
accagccgcc cgtggcgtgc ttgggaaact                                     810

```

10

<210> 32

<211> 1185

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento en el extremo C de HisRS1

20 <400> 32

```

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt      60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa      120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa      180
gacttcgata ttgccgggaa ttttgacct atgatccctg atgccgaatg tctgaaaatc      240
atgtgtgaga tcctgagcag tctgcagatt ggtgacttcc tggtgaaagt gaacgatcgc      300
cgtattctgg atggaatgtt tgccatttgt ggcgtgtctg acagcaaatt tcgtacgatc      360
tgtagcagcg tggataaact ggataaagtg agctgggagg aggtgaaaaa tgagatggtg      420

```

ggcgaaaaag gtctggcacc tgaagtggct gaccgtatcg gtgattatgt tcagcaacat	480
ggcgggtgttt ctctggtcga acagctgctg caagacccaa aactgagcca gaacaaacag	540
gcactggaag gactgggtga tctgaaactg ctgtttgagt atctgacgct gtttggcatc	600
gatgacaaaa tctcgtttga cctgagcctg gcacgtggtc tggattatta taccggcgtg	660
atctatgaag cgcgcctgct gcaaactcca gcacaagcag gtgaagaacc tctgggtgtt	720
ggtagtgtag cggcaggcgg acgttatgat ggactgggtg ggatgtttga tccgaaaggc	780
cgtaaagttc cgtgtgtcgg tctgagtatc ggggttgagc gtatctttag cattgtggag	840
caacgtctgg aagctctgga ggaaaaaatc cgtaccaccg aaaccaagt tctggttgcc	900
tcagctcaga aaaaactgct ggaagaacgc ctgaaactgg ttagcgaact gtgggatgct	960
ggcattaaag ccgaactgct gtataaaaaa aacccgaaac tgctgaatca gctgcagtat	1020
tgtgaggaag cgggtattcc tctggtggcc attatcggag aacaggaact gaaagacggc	1080
gttattaaac tgcgtagcgt gacctctcgt gaagaagttg acgttcgccg tgaagatctg	1140
gtcgaggaaa tcaaactcgt taccgggtcaa cctctgtgta tttgc	1185

<210> 33

<211> 1077

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento en el extremo C de HisRS1

<400> 33

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt	60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa	120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa	180
gtgaatgatc gccgtatcct ggatggcatg tttgccattt gtggtgtgag cgactcgaaa	240
ttccgtacga tttgctctag cgtcgataaa ctggacaaag tgcctggga agaggtgaaa	300
aacgagatgg tgggtgagaa aggtctggct cctgaagttg ccgaccgtat tggtgattat	360
gttcagcagc atggcgggtg ttcactgggt gaacaactgc tgcaagacct gaaactgtct	420
cagaataaac aggcgctgga aggactggga gatctgaaac tgctgtttga gtatctgacc	480
ctgttcggca ttgatgacaa aatcagcttc gacctgagcc tggcacgtgg tctggattat	540
tataccggcg tgatctatga agccgttctg ctgcagacac cagcacaagc aggcgaagaa	600
cctctgggtg ttggttctgt ggcagccggt ggtcgttatg atggactggt aggcattgtc	660
gatccgaaag gccgtaaaagt tccgtgtgtg ggactgagta tcggtgttga gcgtatcttt	720
agcatcgtgg aacaacgtct ggaagcgtg gaggagaaaa ttcgtaccac cgaaacccaa	780

gttctggttg cctcagctca gaaaaaactg ctggaagaac gcctgaaact ggtagcgaa	840
ctgtgggatg ctggcattaa agccgaactg ctgtataaaa aaaacccgaa actgctgaat	900
cagctgcagt attgtgagga agcgggtatt cctctggttg ccattatcgg agaacaggaa	960
ctgaaagacg gcgttattaa actgcgtagc gtgacctctc gtgaagaagt tgacgttcgc	1020
cgtgaagatc tggtcgagga aatcaaacgt cgtaccggtc aacctctgtg tattttgc	1077

<210> 34

<211> 1197

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento en el extremo C de HisRS1

<400> 34

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt	60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa	120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa	180
ggaactcgtg attatagccc tcgccagatg gctgtccgtg aaaaagtgtt cgatgtgatc	240
attcgtctgt tcaaactgtca tgggtgccgaa gtcattgata ccccggtgtt cgagctgaaa	300
gtgaacgatc gccgtattct ggatggcatg ttcgccattt gtggtgttag cgatagcaaa	360
ttccgtacaa tctgctctag cgtggacaaa ctggacaaag tgagctggga agaggtgaaa	420
aacgagatgg tgggtgagaa aggcctggct cctgaagttg ccgaccgtat cgagattat	480
gttcagcagc atggcgaggt ttcactgggt gaacaactgc tgcaagacc gaaactgtct	540
cagaacaaac aggcactgga aggtctggga gatctgaaac tgctgttcga gtatctgacg	600
ctgttcggta ttgacgacaa aatttccttc gacctgtcgc tggcacgtgg tctggattat	660
tatacaggcg tgatctatga ggctgtactg ctgcagacac cagcacaagc aggtgaagag	720
cctctgggtg ttggttcagt tgctgccggt ggacgttatg acggactggt agggatgttt	780
gacccaaaag gccgtaaagt cccgtgtgta ggaactgtcta ttggcgtga gcgtatcttt	840
agcatcgtgg agcaacgtct ggaagctctg gaggagaaaa tccgtaccac cgaaacccaa	900
gttctggttg cctcagctca gaaaaaactg ctggaagaac gcctgaaact ggtagcgaa	960
ctgtgggatg ctggcattaa agccgaactg ctgtataaaa aaaacccgaa actgctgaat	1020
cagctgcagt attgtgagga agcgggtatt cctctggttg ccattatcgg agaacaggaa	1080
ctgaaagacg gcgttattaa actgcgtagc gtgacctctc gtgaagaagt tgacgttcgc	1140
cgtgaagatc tggtcgagga aatcaaacgt cgtaccggtc aacctctgtg tattttgc	1197

15

<210> 35

<211> 1419

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento en el extremo C de HisRS1

5

<400> 35

```

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt      60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa      120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa      180
ggaactcgtg attatagccc tcgccagatg gctgtccgtg aaaaagtgtt cgatgtgatc      240
attcgtctgct tcaaactgca tgggtgccga gtcatgtata ccccggtgtt cgagctgaaa      300
gaaaccctga tgggcaaata tggggaagat tccaaactga tctatgacct gaaagaccag      360
ggaggtgaac tgctgtctct gcgctatgac ctgactgttc cttttgctcg ctatctggcc      420
atgaataaac tgaccaacat caaacgtat catatcgcca aagtgtatcg ccgtgacaat      480
ccagcaatga cccgtggtcg ttatcgtgaa ttttatcagt gtgtgaacga tcgccgtatt      540
ctggacggca tgttcgccat ttgtggtgtg tctgactcca aatttcgtac gatctgctca      600
agcgtggaca aactggacaa agtgagctgg gaagaggtga aaaacgagat ggtgggtgag      660
aaaggcctgg ctctgaaagt tgccgaccgt atcggagatt atgttcagca gcatggcgga      720
gtttcactgg ttgaacaact gctgcaagac ccgaaactgt cacagaacaa acaggcactg      780
gaaggtctgg gggatctgaa actgctgttc gagtatctga cgctgttcgg tattgacgac      840
aaaatcagct tcgatctgag cctggcacgt ggtctggact attataccgg cgtgatttat      900
gaagccgttc tgctgcagac tccagcacia gcaggtgaag agcctctggg tgttgaagt      960
gtggcagccg gtggccgtta tgatggtctg gttggcatgt ttgaccgaa aggccgtaaa     1020
gtcccgtgtg taggactgtc tatcggcgtg gagcgtatct ttagcatcgt ggaacaacgc     1080
ctggaagctc tggaagagaa aatccgtacc accgaaaccc aagtctctgt tgcctcagct     1140
cagaaaaaac tgctggaaga acgcctgaaa ctgggttagcg aactgtggga tgctggcatt     1200
aaagccgaac tgctgtataa aaaaaacccg aaactgctga atcagctgca gtattgtgag     1260
gaagcgggta ttctctgtgt ggccattatc ggagaacagg aactgaaaga cggcgttatt     1320
aaactgcgta gcgtgacctc tcgtgaagaa gttgacgttc gccgtgaaga tctggtcgag     1380
gaaatcaaac gtctgaccgg tcaacctctg tgtatttgc      1419

```

10 <210> 36

<211> 1407

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento en el extremo C de HisRS1

<400> 36

ES 2 652 136 T3

```

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt      60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa      120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa      180
gaaaccctga tgggcaaata tggcgaagat tccaaactga tctatgacct gaaagaccaa      240
ggcgggtgaac tgctgtccct gcgttatgac ctgactgttc cgtttgctcg ttatctggcc      300
atgaataaac tgaccaacat taaacgctat cacattgcc aagtgtatcg ccgtgacaat      360
cctgctatga ctctgggacg ttatcgtgaa ttctatcagt gtgacttcga tattgccggc      420
aacttcgacc ctatgattcc ggatgctgaa tgcctgaaaa tcatgtgtga gatcctgagc      480
agcctgcaaa ttggtgactt cctggtgaaa gtgaatgacc gtcgtatcct ggatggcatg      540
ttcgccattt gtggtgtag cgattccaaa ttccgtacca tctgtagtag tgtggacaaa      600
ctggataaag tgagctggga agaggtgaaa aacgaaatgg tgggcgaaaa aggtctggca      660
cctgaggttg ctgatcgtat cggtgactat gtccagcagc atggaggtgt ttactcgtt      720
gagcaactgc tgcaagatcc gaaactgtct cagaacaaac aggccctgga aggactgggt      780
gatctgaaac tgctgttcga gtatctgacg ctgttcggta ttgatgacaa aatctcgttc      840
gacctgtctc tggctcgtgg actggattat tatacgggcg taatctatga agctgtcctg      900
ctgcagacac cagcacaagc aggtgaagag cctctgggtg ttggaagtgt tgctgccggt      960
ggtcgctatg acggactggt tggcatgttc gatccgaaag gccgtaaagt tccgtgtgta     1020
ggactgagca ttggcggtga gcgtatcttt tccatcgttg agcaacgtct ggaagcactg     1080
gaagagaaaa tccgtaccac cgaaacccaa gttctggttg cctcagctca gaaaaaactg     1140
ctggaagaac gcctgaaact ggtagcgaa ctgtgggatg ctggcattaa agccgaactg     1200
ctgtataaaa aaaacccgaa actgctgaat cagctgcagt attgtgagga agcgggtatt     1260
cctctgggtg ccattatcgg agaacaggaa ctgaaagacg gcgttattaa actgcgtagc     1320
gtgacctctc gtgaagaagt tgacgttcgc cgtgaagatc tggtcgagga aatcaaacgt     1380
cgtaccggtc aacctctgtg tatttgc                                     1407

```

<210> 37

5 <211> 1305

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones del extremo C de HisRS1

<400> 37

ES 2 652 136 T3

```

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt      60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa      120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa      180
ggaactcgtg attatagccc tcgccagatg gctgtccgtg aaaaagtgtt cgatgtgata      240
attcgtgtgct tcaaactgca tgggtgccga gtcatatgata ccccggtgtt cgagctgaaa      300
gatttcgata ttgccggcaa ctttgatccg atgattccgg atgctgagtg tctgaaaatc      360
atgtgtgaga tcctgagtag tctgcagatt ggggatttcc tggtgaaagt gaacgatcgc      420
cgtattctgg acggcatgtt tgccatttgt ggcgttagcg atagcaaatt ccgtacgatc      480
tgtagcagtg tggacaaact ggataaagtc tcttggaag aggtcaaaaa cgagatgggt      540
ggtagagaaag gcctgggtcc tgaagtggct gaccgtattg gtgattatgt ccagcagcat      600
ggtggtgttt cactggttga acaactgctg caagaccgca aactgtctca gaacaaacag      660
gcactggaag gtctgggtga tctgaaactg ctgttcgagt atctgacgct gttcgggtatt      720
gacgacaaaa ttctcttcga cctgtcactg gcacgtggtc tggattatta tacaggcgta      780
atctatgagg ctgtactgct gcaaactcca gcacaagcag gtgaagaacc tctgggagtt      840
ggtagtgtag cggcaggggg tcgttatgat gggctggtcg ggatgttcga tccaaaaggc      900
cgtaaagtcc cgtgtgttgg tctgtctatt ggcgttgagc gtatcttctc catcgtggag      960
caacgtctgg aagctctgga agaaaaaatc cgtaccaccg aaaccaagt tctggttgcc      1020
tcagctcaga aaaaactgct ggaagaacgc ctgaaactgg ttagcgaact gtgggatgct      1080
ggcattaaag ccgaactgct gtataaaaaa aaccggaaac tgctgaatca gctgcagtat      1140
tgtgaggaag cgggtattcc tctggtggcc attatcggag aacaggaact gaaagacggc      1200
gttattaaac tgcgtagcgt gacctctcgt gaagaagttg acgttcgccg tgaagatctg      1260
gtcgaggaaa tcaaactcgt taccgggtcaa cctctgtgta tttgc      1305

```

<210> 38

5 <400> 38

000

<210> 39

10 <211> 506

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

15

```

Met Pro Leu Leu Gly Leu Leu Pro Arg Arg Ala Trp Ala Ser Leu Leu
1           5           10           15

```

```

Ser Gln Leu Leu Arg Pro Pro Cys Ala Ser Cys Thr Gly Ala Val Arg

```

ES 2 652 136 T3

20					25					30					
Cys	Gln	Ser	Gln	Val	Ala	Glu	Ala	Val	Leu	Thr	Ser	Gln	Leu	Lys	Ala
		35					40					45			
His	Gln	Glu	Lys	Pro	Asn	Phe	Ile	Ile	Lys	Thr	Pro	Lys	Gly	Thr	Arg
		50					55					60			
Asp	Leu	Ser	Pro	Gln	His	Met	Val	Val	Arg	Glu	Lys	Ile	Leu	Asp	Leu
65					70					75					80
Val	Ile	Ser	Cys	Phe	Lys	Arg	His	Gly	Ala	Lys	Gly	Met	Asp	Thr	Pro
				85					90					95	
Ala	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Glu	Lys	Tyr	Gly	Glu	Asp	Ser
		100						105					110		
Gly	Leu	Met	Tyr	Asp	Leu	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu
		115					120					125			
Arg	Tyr	Asp	Leu	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys
		130					135					140			
Val	Lys	Lys	Met	Lys	Arg	Tyr	His	Val	Gly	Lys	Val	Trp	Arg	Arg	Glu
145					150					155					160
Ser	Pro	Thr	Ile	Val	Gln	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu	Phe	Cys	Gln	Cys	Asp
				165					170					175	
Phe	Asp	Ile	Ala	Gly	Gln	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys
		180						185					190		
Leu	Lys	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Gly	Leu	Gln	Leu	Gly	Asp	Phe
		195					200					205			
Leu	Ile	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Val	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Val
		210					215					220			
Cys	Gly	Val	Pro	Glu	Ser	Lys	Phe	Arg	Ala	Ile	Cys	Ser	Ser	Ile	Asp
225					230					235					240
Lys	Leu	Asp	Lys	Met	Ala	Trp	Lys	Asp	Val	Arg	His	Glu	Met	Val	Val
				245					250					255	
Lys	Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val
		260						265					270		

ES 2 652 136 T3

Gln Cys His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Met Phe Gln Asp Pro
275 280 285

Arg Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys
290 295 300

Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Ala Asp Lys Ile Ser
305 310 315 320

Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile
325 330 335

Tyr Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Thr Gln Ala Gly Glu Glu Pro
340 345 350

Leu Asn Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val
355 360 365

Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly His Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser
370 375 380

Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Tyr Ile Val Glu Gln Arg Met Lys Thr
385 390 395 400

Lys Gly Glu Lys Val Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Phe Val Ala Thr
405 410 415

Pro Gln Lys Asn Phe Leu Gln Glu Arg Leu Lys Leu Ile Ala Glu Leu
420 425 430

Trp Asp Ser Gly Ile Lys Ala Glu Met Leu Tyr Lys Asn Asn Pro Lys
435 440 445

Leu Leu Thr Gln Leu His Tyr Cys Glu Ser Thr Gly Ile Pro Leu Val
450 455 460

Val Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Glu Gly Val Ile Lys Ile Arg
465 470 475 480

Ser Val Ala Ser Arg Glu Glu Val Ala Ile Lys Arg Glu Asn Phe Val
485 490 495

Ala Glu Ile Gln Lys Arg Leu Ser Glu Ser
500 505

<210> 40

<211> 198

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 652 136 T3

<223> Resokine de codificación en extremo ADN con optimización de codones (fragmento en el extremo N de HisRS) para expresión de E. coli

<400> 40

```

5      atggcagaac gtgcggcatt ggaagaattg gttaaactgc aaggtgaacg tgttcgtggt      60
      ctgaagcagc agaaggctag cgcggagctg atcgaagaag aggtggccaa actgctgaag      120
      ctgaaggcgc agctgggccc ggacgagagc aaacaaaagt tcgtcctgaa aaccccgaaa      180
      caccaccatc accatcac                                          198
  
```

<210> 41

<211> 66

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Resokine (fragmento en el extremo N de HisRs) con etiqueta His

<400> 41

```

      Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
      1              5              10              15

      Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
              20              25              30

      Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
              35              40              45

      Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys His His His His
              50              55              60

      His His
      65
  
```

20

<210> 42

<211> 1563

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Gen HisRS de longitud completa con optimización de codones para expresión de E. coli

30 <400> 42

```

      atggcggaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt      60
      cttaacaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgccaa attactgaaa      120
      ctgaaagctc aacttgacc cgatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgccc aaa      180
      ggaacccgtg attatagtcc acgtcaaagt gccgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt      240
  
```

ES 2 652 136 T3

```

attcgctggt ttaaactgca cgggtgctgaa gtaatcgata cccccgtatt tgaattgaaa 300
gagactctga tgggcaaata tggatgaagat tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa 360
ggaggtgaac tgcctgagcct gcgctacgac ttaactgtgc cttttgcccg ttacttagcc 420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac 480
cctgcaatga ctgctggacg ctatcgcgaa ttctatcagt gtgattttga tattgccgga 540
aatctcgacc cgatgatccc ggatgccgag tgtttgaaaa ttatgtgtga aattctgagt 600
tcgttgcaga tcggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatggtatg 660
tttgcatttt gcggtgtttc tgattccaaa ttccgtacaa tctgctcaag cgtggacaaa 720
ttggataaag tgtcttgga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct 780
ccagaagtag cagaccgtat tgggtgactat gttcaacaac atggcggtgt gtccttagtc 840
gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaataaac aagcactga aggactggga 900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttggga ttgatgataa aattagcttt 960
gatctgagct tggcccgcg tcttgattat tataccggcg tgatttacga agctgttctc 1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag cctttgggag tcggcagtg ggcagccggt 1080
ggcgttatg atggtttggt aggaatgttt gaccctaaag gccgtaaagt accatgtgtg 1140
gggctttcta tcggtgtcga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg 1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaacccaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaactg 1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg 1320
ctgtataaaa agaaccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggatc 1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa taaaagatg gcgtgattaa actgcgttca 1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc 1500
cgcaccggtc aaccgttatg tatttgcgcg gccgcactcg agcaccacca ccaccaccac 1560
tga 1563

```

<210> 43

<211> 520

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> HisRS de longitud completa con etiqueta His

<400> 43

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1           5           10           15

```

```

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20           25           30

```

15

ES 2 652 136 T3

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
 50 55 60
 Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
 65 70 75 80
 Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
 85 90 95
 Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
 100 105 110
 Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
 115 120 125
 Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
 130 135 140
 Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
 145 150 155 160
 Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
 165 170 175
 Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
 180 185 190
 Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
 195 200 205
 Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys
 210 215 220
 Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
 245 250 255
 Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys

ES 2 652 136 T3

275		280		285
Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu				
290		295		300
Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe				
305		310		315
Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr				
	325		330	335
Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu				
	340		345	350
Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly				
	355		360	365
Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile				
	370		375	380
Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu				
	385		390	395
Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala				
	405		410	415
Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp				
	420		425	430
Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu				
	435		440	445
Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala				
	450		455	460
Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser				
	465		470	475
Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu				
	485		490	495
Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys Ala Ala Ala				
	500		505	510
Leu Glu His His His His His His				
	515		520	

<210> 44

<211> 41

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador diseñado para mutar selectivamente un residuo de cisteína

5 <400> 44

gtttgacgta atcatccgtt gcttcaagcg ccacggtgca g 41

<210> 45

10 <211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Cebador diseñado para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 45

20 ctgcaccgtg gcgcttgaag caacggatga ttacgtcaaa c 41

<210> 46

<211> 44

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador diseñado para mutar selectivamente un residuo de cisteína

30

<400> 46

gccgataccg ggaattctac cagtgtgatt ttgacattgc tggg 44

35 <210> 47

<211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Cebador diseñado para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 47

45

cccagcaatg tcaaaatcac actggtagaa ttcccggtat cggc 44

<210> 48

<211> 41

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Cebador

<400> 48

ccatgatccc tgaatgcagag tgctgaaga tcatgtgcga g 41

60

<210> 49

<211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 49
 10 ctcgcacatg atcttcaggc actctgcatc agggatcatg g 41
 <210> 50
 <211> 43
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador
 <400> 50
 gcagagtgcc tgaagatcat gtgcgagatc ctgagttcac ttc 43
 25 <210> 51
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador
 35 <400> 51
 gaagtgaact caggatctcg cacatgatct tcaggcactc tgc 43
 <210> 52
 40 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Cebador
 <400> 52
 50 ctagatggga tgtttgctat ctgtggtgtt tctgacagca agttc 45
 <210> 53
 <211> 45
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 53

gaacttgctg tcagaaacac cacagatagc aaacatccca tctag 45

<210> 54
5 <211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Cebador

<400> 54

15 cagcaagttc cgtaccatct gctcctcagt agacaagctg g 41

<210> 55
<211> 41
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

25 <400> 55

ccagcttgct tactgaggag cagatggtac ggaacttgct g 41

30 <210> 56
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador

<400> 56

40 gggcgcaagg tgccatgtgt ggggctcagc attgggg 37

<210> 57
<211> 37
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Cebador

<400> 57

ccccaatgct gagccccaca catggcacct tgcgccc 37

55 <210> 58
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Cebador

<400> 58

5 ctgaaccagt tacagtactg tgaggaggca ggcattccc 38

<210> 59

<211> 38

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 59

gggatgctg cctcctcaca gtactgtaac tggttcag 38

20 <210> 60

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Cebador

30 <400> 60

gagaacaggc cagcccctct gcatctgcta gaaccacgc 39

<210> 61

35 <211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Cebador

<400> 61

45 gctgggttct agcagatgca gaggggctgg cctgttctc 39

<210> 62

<211> 37

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

55 <400> 62

ccagcccctc tgcattgct agaaccacgc ttcttg 37

60 <210> 63

<211> 37

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador

 <400> 63

 10 caagaaagct gggttctagc agatgcagag gggctgg 37

 <210> 64
 <211> 35
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>

 <223> Cebador
 20 <400> 64

 gaacaggcca gccctctag aaccagctt tcttg 35

 25 <210> 65
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>

 <223> Cebador

 <400> 65
 35 caagaaagct gggttctaga ggggctggcc tgttc 35

 <210> 66
 <211> 41
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>

 45 <223> Cebador

 <400> 66

 cgccgcaccg gtcaaccgtt acaccaccac caccaccact g 41
 50
 <210> 67
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>

 <223> Cebador
 60 <400> 67

cagtgggtgt ggtgggtgtg taacggttga ccggtgcggc g 41

<210> 68
 <211> 39
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador

<400> 68

cgccgcaccg gtcaaccgtt atgagatccg gctgctaac 39

15 <210> 69
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador

25 <400> 69

gtagcagcc ggaatcata acggttgacc ggtgcggcg 39

<210> 70
 30 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 70

35

ES 2 652 136 T3

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

ES 2 652 136 T3

Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
 245 250 255
 Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 450 455 460
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 465 470 475 480
 Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
 485 490 495
 Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
 500 505

5 <210> 71
 <211> 48

ES 2 652 136 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

5 Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

<210> 72
<211> 1518

10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento en el extremo N de HisRS1

<400> 72

atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
ggcacaagag actatagtcc ccggcagatg gcagttcgcg agaaggtgtt tgacgtaatc 240
atccgttgct tcaagcgcca cgggtgcagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
gaaacactga tgggaaagta tggggaagac tccaagctta tctatgacct gaaggaccag 360
ggcggggagc tcctgtccct tcgctatgac ctcactgttc cttttgctcg gtatttggca 420
atgaataaac tgaccaacat taaacgctac cacatagcaa aggtatatcg gcgggataac 480
ccagccatga ccggtggccg ataccgggaa ttctaccagt gtgattttga cattgctggg 540
aactttgatc ccatgatccc tgatgcagag tgccctgaaga tcatgtgcga gatcctgagt 600
tcacttcaga taggcgactt cctgggtcaag gtaaacgata gacgcattct agatgggatg 660
tttgctatct gtggtgtttc tgacagcaag ttccgtacca tctgctcctc agtagacaag 720
ctggacaagg tgtcctggga agaggtgaag aatgagatgg tgggagagaa gggccttgca 780
cctgaggtgg ctgaccgcat tggggactat gtccagcaac atggtggggg atccctggtg 840

20

```

gaacagctgc tccaggatcc taaactatcc caaaacaagc aggccttgga ggccttgga      900
gacctgaagt tgctctttga gtacctgacc ctatttggca ttgatgacaa aatctccttt      960
gacctgagcc ttgctcgagg gctggattac tacactgggg tgatctatga ggcagtgtgt      1020
ctacagaccc cagcccaggc aggggaagag cccctgggtg tgggcagtgt ggctgtgtga      1080
ggacgctatg atgggctagt gggcatgttc gaccccaaag ggcgcaaggt gccatgtgtg      1140
gggctcagca ttgggggtga gcggtatttc tccatcgtgg aacagagact agaggctttg      1200
gaggagaaga tacggaccac ggagacacag gtgcttgtgg catctgcaca gaagaagctg      1260
ctagaggaaa gactaaagct tgtctcagaa ctgtgggatg ctgggatcaa ggctgagctg      1320
ctgtacaaga agaaccctaaa gctactgaac cagttacagt actgtgagga ggcaggcatc      1380
ccactgggtg ctatcatcgg cgagcaggaa ctcaaggatg gggcatcaa gctccgttca      1440
gtgacgagca gggaagaggt ggatgtccga agagaagacc ttgtggagga aatcaaaagg      1500
agaacaggcc agcccctc                                     1518

```

<210> 73

<211> 144

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Fragmento de ácidos nucleicos con optimización de codones para fragmento en el extremo N de HisRS1

<400> 73

```

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt      60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa      120
ctgaaagcac agctgggtcc tgat                                     144

```

15

<210> 74

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 74

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1           5           10           15

```

```

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20           25           30

```

```

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35           40           45

```

```

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
          50           55           60

```

```

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
          65           70           75           80

```

25

ES 2 652 136 T3

<210> 75

<211> 79

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 75

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val
65 70 75

10

<210> 76

<211> 78

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 76

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp
65 70 75

20 <210> 77

<211> 77

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 77

ES 2 652 136 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe
65 70 75

<210> 78

<211> 76

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val
65 70 75

10

<210> 79

<211> 75

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 79

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu

20

ES 2 652 136 T3

20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys
65 70 75

<210> 80
<211> 74
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu
65 70

10
<210> 81
<211> 73
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 81

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg
65 70

20

ES 2 652 136 T3

<210> 82
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 82

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50          55          60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val
65          70
  
```

10 <210> 83
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 83

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50          55          60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala
65          70
  
```

20 <210> 84
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 84

ES 2 652 136 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met
65 70

<210> 85

<211> 69

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln
65

10

<210> 86

<211> 68

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 86

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu

20

ES 2 652 136 T3

20

25

30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg
65

<210> 87

<211> 67

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro
65

10

<210> 88

<211> 66

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 88

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

20

Tyr Ser
65

ES 2 652 136 T3

<210> 89
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 89

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1              5              10              15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20              25              30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35              40              45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
 50              55              60

Tyr
65
  
```

10 <210> 90
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 90

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1              5              10              15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20              25              30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35              40              45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
 50              55              60
  
```

20 <210> 91
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 91

25

ES 2 652 136 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg
50 55 60

<210> 92

<211> 62

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr
50 55 60

10

<210> 93

<211> 61

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 93

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly
50 55 60

20

<210> 94

<211> 60

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 94

ES 2 652 136 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
50 55 60

<210> 95

5 <211> 59

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

10

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro
50 55

<210> 96

<211> 58

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

20

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr
50 55

<210> 97

25 <211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 652 136 T3

<400> 97

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys
 50          55

```

5 <210> 98
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 98

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu
 50          55

```

<210> 99
 15 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 99

20

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val
 50          55

```

25 <210> 100
 <211> 54
 <212> PRT

ES 2 652 136 T3

<213> Homo sapiens

<400> 100

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe
5          50

```

<210> 101

<211> 53

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 101

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys Gln Lys
15          50

```

<210> 102

<211> 52

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 102

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys Gln
25          50

```

<210> 103

<211> 51

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103

5

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys
      50

```

<210> 104

<211> 50

10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 104

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser
      50

```

15

<210> 105

<211> 49

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 105

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu

```

25

<210> 106

<211> 48

ES 2 652 136 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106

5

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

<210> 107

<211> 47

10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 107

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro
35 40 45

15

<210> 108

<211> 46

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 108

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly
35 40 45

25

<210> 109

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 109

ES 2 652 136 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu
35 40 45

<210> 110

<211> 44

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln
35 40

10

<210> 111

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 111

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

20

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala
35 40

<210> 112

<211> 42

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

ES 2 652 136 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys
35 40

<210> 113

<211> 41

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu
35 40

10

<210> 114

<211> 40

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 114

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

20

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys
35 40

<210> 115

<211> 79

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

ES 2 652 136 T3

Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg
1 5 10 15

Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu
20 25 30

Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu
35 40 45

Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr
50 55 60

Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75

<210> 116

<211> 78

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val
1 5 10 15

Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu
20 25 30

Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser
35 40 45

Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser
50 55 60

Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75

10

<210> 117

<211> 77

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 117

ES 2 652 136 T3

Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg
1 5 10 15

Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val
20 25 30

Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys
35 40 45

Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro
50 55 60

Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75

<210> 118

<211> 76

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly
1 5 10 15

Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala
20 25 30

Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln
35 40 45

Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg
50 55 60

Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75

10

<210> 119

<211> 75

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 119

Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu
1 5 10 15

Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys
20 25 30

20

ES 2 652 136 T3

Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys
35 40 45

Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln
50 55 60

Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75

<210> 120

<211> 74

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys
1 5 10 15

Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu
20 25 30

Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe
35 40 45

Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met
50 55 60

Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70

<210> 121

<211> 73

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 121

Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln
1 5 10 15

Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu
20 25 30

Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val
35 40 45

Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala
50 55 60

Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70

<210> 122

<211> 72

25 <212> PRT

ES 2 652 136 T3

<213> Homo sapiens

<400> 122

```

Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln
1          5          10          15

Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys
          20          25          30

Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu
          35          40          45

Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val
          50          55          60

Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
5      65          70

```

<210> 123

<211> 71

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 123

```

Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys
1          5          10          15

Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu
          20          25          30

Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys
          35          40          45

Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg
          50          55          60

Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
15      65          70

```

<210> 124

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 124

ES 2 652 136 T3

Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala
1 5 10 15

Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys
20 25 30

Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr
35 40 45

Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu
50 55 60

Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70

<210> 125

<211> 69

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser
1 5 10 15

Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala
20 25 30

Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro
35 40 45

Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys
50 55 60

Val Phe Asp Val Ile
65

10

<210> 126

<211> 68

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 126

Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala
1 5 10 15

Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln
20 25 30

20

ES 2 652 136 T3

Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
35 40 45

Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val
50 55 60

Phe Asp Val Ile
65

<210> 127

<211> 67

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu
1 5 10 15

Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu
20 25 30

Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly
35 40 45

Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe
50 55 60

Asp Val Ile
65

10

<210> 128

<211> 66

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 128

Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu
1 5 10 15

Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly
20 25 30

Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr
35 40 45

Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp
50 55 60

20

Val Ile
65

<210> 129

<211> 64

25 <212> PRT

ES 2 652 136 T3

<213> Homo sapiens

<400> 129

```

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          20          25          30

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
          35          40          45

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
5          50          55          60

```

<210> 130

<211> 63

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 130

```

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

Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu
          20          25          30

Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr
          35          40          45

Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
          50          55          60

```

15

<210> 131

<211> 62

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 131

```

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

Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser
          20          25          30

Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser
          35          40          45

Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
25          50          55          60

```

25

<210> 132

ES 2 652 136 T3

<211> 61
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 132

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

<210> 133
10 <211> 60
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 133

15

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

<210> 134
<211> 59
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 134

Lys	Gln	Gln	Lys	Ala	Ser	Ala	Glu	Leu	Ile	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Lys
1				5				10						15	
Leu	Leu	Lys	Leu	Lys	Ala	Gln	Leu	Gly	Pro	Asp	Glu	Ser	Lys	Gln	Lys
		20						25					30		
Phe	Val	Leu	Lys	Thr	Pro	Lys	Gly	Thr	Arg	Asp	Tyr	Ser	Pro	Arg	Gln
		35					40				45				
Met	Ala	Val	Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	Val	Ile					
	50					55									

25

ES 2 652 136 T3

<210> 135
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 135

Gln	Gln	Lys	Ala	Ser	Ala	Glu	Leu	Ile	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Lys	Leu
1				5					10					15	
Leu	Lys	Leu	Lys	Ala	Gln	Leu	Gly	Pro	Asp	Glu	Ser	Lys	Gln	Lys	Phe
			20					25					30		
Val	Leu	Lys	Thr	Pro	Lys	Gly	Thr	Arg	Asp	Tyr	Ser	Pro	Arg	Gln	Met
		35					40					45			
Ala	Val	Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	Val	Ile						
	50						55								

10 <210> 136
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 136

Gln	Lys	Ala	Ser	Ala	Glu	Leu	Ile	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Lys	Leu	Leu
1				5				10					15		
Lys	Leu	Lys	Ala	Gln	Leu	Gly	Pro	Asp	Glu	Ser	Lys	Gln	Lys	Phe	Val
			20					25					30		
Leu	Lys	Thr	Pro	Lys	Gly	Thr	Arg	Asp	Tyr	Ser	Pro	Arg	Gln	Met	Ala
		35					40					45			
Val	Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	Val	Ile							
	50						55								

20 <210> 137
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 137

Lys	Ala	Ser	Ala	Glu	Leu	Ile	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys
1				5				10					15		
Leu	Lys	Ala	Gln	Leu	Gly	Pro	Asp	Glu	Ser	Lys	Gln	Lys	Phe	Val	Leu
			20					25					30		
Lys	Thr	Pro	Lys	Gly	Thr	Arg	Asp	Tyr	Ser	Pro	Arg	Gln	Met	Ala	Val
		35					40					45			
Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	Val	Ile								
	50						55								

ES 2 652 136 T3

<210> 138

<211> 55

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 138

Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu
1 5 10 15

Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys
20 25 30

Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg
35 40 45

Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
50 55

10

<210> 139

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 139

Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys
1 5 10 15

Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr
20 25 30

Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu
35 40 45

Lys Val Phe Asp Val Ile
50

20

<210> 140

<211> 53

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 140

ES 2 652 136 T3

Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala
1 5 10 15

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

Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys
35 40 45

Val Phe Asp Val Ile
50

<210> 141

<211> 52

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln
1 5 10 15

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

Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val
35 40 45

Phe Asp Val Ile
50

10

<210> 142

<211> 51

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 142

Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu
1 5 10 15

20

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

Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe
35 40 45

Asp Val Ile
50

<210> 143

<211> 50

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

ES 2 652 136 T3

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

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

Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp
35 40 45

Val Ile
50

<210> 144

5 <211> 49

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

10

Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro
1 5 10 15

Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg
20 25 30

Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val
35 40 45

Ile

<210> 145

<211> 48

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
1 5 10 15

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
20 25 30

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40 45

20

<210> 146

<211> 47

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 146

ES 2 652 136 T3

Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu
1 5 10 15

Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr
20 25 30

Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40 45

<210> 147

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

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

Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser
20 25 30

Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40 45

10

<210> 148

<211> 45

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 148

Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys
1 5 10 15

20

Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro
20 25 30

Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40 45

<210> 149

<211> 44

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln
1 5 10 15

Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg
20 25 30

Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40

30

ES 2 652 136 T3

<210> 150
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 150

Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys
 1 5 10 15

Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln
 20 25 30

Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
 35 40

10 <210> 151

<211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 151

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

Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met
 20 25 30

Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
 35 40

<210> 152

20 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 152

25

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

Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala
 20 25 30

Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
 35 40

<210> 153

<211> 40

30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 153

ES 2 652 136 T3

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

Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val
20 25 30

Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40

<210> 154

<211> 15

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 154

10 aaacaaaaca aaaca 15

<210> 155

<211> 10

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 155

20 aaacaaaaca 10

<210> 156

<211> 10

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<400> 156

caaaacaaaa 10

30 <210> 157

<211> 15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

35 <400> 157

caaaacaaaa caaaa 15

<210> 158

40 <211> 10

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 158

45 aaacaaaaca 10

<210> 159

<211> 10

50 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 159

ES 2 652 136 T3

acaaaacaaa 10

<210> 160

5 <211> 500

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 160

10

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

ES 2 652 136 T3

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

ES 2 652 136 T3

Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
370 375 380

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
385 390 395 400

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
405 410 415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg
500

<210> 161

<211> 501

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 161

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

10

ES 2 652 136 T3

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130 135 140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145 150 155 160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
165 170 175

Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
180 185 190

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
195 200 205

Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys
210 215 220

Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
225 230 235 240

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

Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
260 265 270

Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
275 280 285

Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
290 295 300

Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
305 310 315 320

Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
325 330 335

ES 2 652 136 T3

Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 450 455 460
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 465 470 475 480
 Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
 485 490 495
 Glu Ile Lys Arg Arg
 500

<210> 162

<211> 502

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 162

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45

10

ES 2 652 136 T3

Glu 50	Ser	Lys	Gln	Lys	Phe	Val 55	Leu	Lys	Thr	Pro	Lys 60	Gly	Thr	Arg	Asp
Tyr 65	Ser	Pro	Arg	Gln	Met 70	Ala	Val	Arg	Glu	Lys 75	Val	Phe	Asp	Val	Ile 80
Ile	Arg	Cys	Phe	Lys 85	Arg	His	Gly	Ala	Glu	Val 90	Ile	Asp	Thr	Pro 95	Val
Phe	Glu	Leu	Lys 100	Glu	Thr	Leu	Met	Gly 105	Lys	Tyr	Gly	Glu	Asp	Ser	Lys
Leu	Ile	Tyr 115	Asp	Leu	Lys	Asp	Gln 120	Gly	Gly	Glu	Leu	Leu 125	Ser	Leu	Arg
Tyr	Asp 130	Leu	Thr	Val	Pro	Phe 135	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala 140	Met	Asn	Lys	Leu
Thr 145	Asn	Ile	Lys	Arg	Tyr 150	His	Ile	Ala	Lys	Val 155	Tyr	Arg	Arg	Asp	Asn 160
Pro	Ala	Met	Thr	Arg 165	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu 170	Phe	Tyr	Gln	Cys	Asp 175	Phe
Asp	Ile	Ala	Gly 180	Asn	Phe	Asp	Pro	Met 185	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu
Lys	Ile	Met 195	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser 200	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly 205	Asp	Phe	Leu
Val 210	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg 215	Ile	Leu	Asp	Gly	Met 220	Phe	Ala	Ile	Cys
Gly 225	Val	Ser	Asp	Ser	Lys 230	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys 235	Ser	Ser	Val	Asp	Lys 240
Leu	Asp	Lys	Val	Ser 245	Trp	Glu	Glu	Val	Lys 250	Asn	Glu	Met	Val	Gly 255	Glu
Lys	Gly	Leu	Ala 260	Pro	Glu	Val	Ala	Asp 265	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln
Gln	His	Gly 275	Gly	Val	Ser	Leu	Val 280	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln 285	Asp	Pro	Lys
Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu

ES 2 652 136 T3

290 295 300

Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
305 310 315 320

Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
325 330 335

Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
340 345 350

Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
355 360 365

Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
370 375 380

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
385 390 395 400

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
405 410 415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr
500

<210> 163

<211> 503

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 163

10

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu

ES 2 652 136 T3

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

ES 2 652 136 T3

Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 450 455 460
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 465 470 475 480
 Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
 485 490 495
 Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly
 500

<210> 164
 <211> 504
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 652 136 T3

<400> 164

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1                               5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
                20                25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
      35                40                45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
 50                55                60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65                70                75                80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
                85                90                95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
                100                105                110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
      115                120                125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
      130                135                140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145                150                155                160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
                165                170                175

Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
                180                185                190

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
      195                200                205

Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys
210                215                220

```

ES 2 652 136 T3

Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
 245 250 255
 Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 450 455 460
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 465 470 475 480
 Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
 485 490 495
 Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln
 500

<210> 165
 <211> 505
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 165

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
          50          55          60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65          70          75          80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
          85          90          95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
          100          105          110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
          115          120          125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130          135          140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145          150          155          160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
          165          170          175

Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
          180          185          190
    
```

ES 2 652 136 T3

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
 195 200 205
 Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys
 210 215 220
 Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
 245 250 255
 Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu

ES 2 652 136 T3

435

440

445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro
500 505

<210> 166

<211> 505

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 166

Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg
1 5 10 15

Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu
20 25 30

Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu
35 40 45

Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr
50 55 60

Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile Ile
65 70 75 80

Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val Phe
85 90 95

Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys Leu
100 105 110

Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg Tyr
115 120 125

Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu Thr
130 135 140

Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn Pro
145 150 155 160

10

ES 2 652 136 T3

Ala	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gln	Cys	Asp	Phe	Asp	165	170	175
Ile	Ala	Gly	Asn	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu	Lys	180	185	190
Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	Val	195	200	205
Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	Gly	210	215	220
Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	225	230	235
Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu	Lys	245	250	255
Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln	Gln	260	265	270
His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys	Leu	275	280	285
Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	Leu	290	295	300
Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Lys	Ile	Ser	Phe	Asp	305	310	315
Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Val	Ile	Tyr	Glu	325	330	335
Ala	Val	Leu	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Gln	Ala	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu	Gly	340	345	350
Val	Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Arg	Tyr	Asp	Gly	Leu	Val	Gly	Met	355	360	365
Phe	Asp	Pro	Lys	Gly	Arg	Lys	Val	Pro	Cys	Val	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	370	375	380
Val	Glu	Arg	Ile	Phe	Ser	Ile	Val	Glu	Gln	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	385	390	395
Glu	Lys	Ile	Arg	Thr	Thr	Glu	Thr	Gln	Val	Leu	Val	Ala	Ser	Ala	Gln			

ES 2 652 136 T3

405

410

415

Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp
420 425 430

Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu
435 440 445

Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile
450 455 460

Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val
465 470 475 480

Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu
485 490 495

Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
500 505

<210> 167

<211> 507

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 167

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

10

ES 2 652 136 T3

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
 130 135 140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
 145 150 155 160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
 165 170 175

Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
 180 185 190

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
 195 200 205

Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys
 210 215 220

Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
 225 230 235 240

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

Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270

Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285

Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300

Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320

Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335

Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350

Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365

Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile

ES 2 652 136 T3

370

375

380

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
385 390 395 400

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
405 410 415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys
500 505

<210> 168

<211> 508

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 168

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

10

ES 2 652 136 T3

Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Lys	Tyr	Gly	Glu	Asp	Ser	Lys	100	105	110
Leu	Ile	Tyr	Asp	Leu	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Arg	115	120	125
Tyr	Asp	Leu	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Leu	130	135	140
Thr	Asn	Ile	Lys	Arg	Tyr	His	Ile	Ala	Lys	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Asn	145	150	155
Pro	Ala	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gln	Cys	Asp	Phe	165	170	175
Asp	Ile	Ala	Gly	Asn	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu	180	185	190
Lys	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	195	200	205
Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	210	215	220
Gly	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	225	230	235
Leu	Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu	245	250	255
Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln	260	265	270
Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys	275	280	285
Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	290	295	300
Leu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Lys	Ile	Ser	Phe	305	310	315
Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Val	Ile	Tyr	325	330	335
Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Gln	Ala	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu			

ES 2 652 136 T3

340							345					350				
Gly	Val	Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Arg	Tyr	Asp	Gly	Leu	Val	Gly	
		355					360					365				
Met	Phe	Asp	Pro	Lys	Gly	Arg	Lys	Val	Pro	Cys	Val	Gly	Leu	Ser	Ile	
	370					375					380					
Gly	Val	Glu	Arg	Ile	Phe	Ser	Ile	Val	Glu	Gln	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	
385					390					395					400	
Glu	Glu	Lys	Ile	Arg	Thr	Thr	Glu	Thr	Gln	Val	Leu	Val	Ala	Ser	Ala	
				405					410					415		
Gln	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Trp	
			420					425					430			
Asp	Ala	Gly	Ile	Lys	Ala	Glu	Leu	Leu	Tyr	Lys	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	
		435					440					445				
Leu	Asn	Gln	Leu	Gln	Tyr	Cys	Glu	Glu	Ala	Gly	Ile	Pro	Leu	Val	Ala	
	450					455					460					
Ile	Ile	Gly	Glu	Gln	Glu	Leu	Lys	Asp	Gly	Val	Ile	Lys	Leu	Arg	Ser	
465					470					475					480	
Val	Thr	Ser	Arg	Glu	Glu	Val	Asp	Val	Arg	Arg	Glu	Asp	Leu	Val	Glu	
				485					490					495		
Glu	Ile	Lys	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro	Leu	Cys	Ile					
			500					505								

<210> 169
<211> 509
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 169

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp

ES 2 652 136 T3

50						55						60			
Tyr	Ser	Pro	Arg	Gln	Met	Ala	Val	Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	Val	Ile
65					70					75					80
Ile	Arg	Cys	Phe	Lys	Arg	His	Gly	Ala	Glu	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Val
				85					90					95	
Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Lys	Tyr	Gly	Glu	Asp	Ser	Lys
			100					105					110		
Leu	Ile	Tyr	Asp	Leu	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Arg
		115					120					125			
Tyr	Asp	Leu	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Leu
	130					135					140				
Thr	Asn	Ile	Lys	Arg	Tyr	His	Ile	Ala	Lys	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Asn
145					150					155					160
Pro	Ala	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gln	Cys	Asp	Phe
				165					170					175	
Asp	Ile	Ala	Gly	Asn	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu
			180					185					190		
Lys	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu
		195					200					205			
Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys
	210					215					220				
Gly	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys
225					230					235					240
Leu	Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu
				245					250					255	
Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln
			260					265					270		
Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys
		275					280					285			
Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu
	290					295					300				

ES 2 652 136 T3

Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 450 455 460
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 465 470 475 480
 Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
 485 490 495
 Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
 500 505

<210> 170

<211> 61

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de HRS con modificación de cisteína

<400> 170

Met Cys Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly
 1 5 10 15

15

ES 2 652 136 T3

Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile
20 25 30

Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro
35 40 45

Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
50 55 60

<210> 171

<211> 60

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de HRS con modificación de cisteína

<400> 171

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Cys Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
50 55 60

15

<210> 172

<211> 61

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Polipéptido de HRS con modificación de cisteína

25 <400> 172

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Cys

50

55

60

30

<210> 173
 <211> 183
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> HRS con modificación de cisteína que codifica polinucleótido

10 <400> 173

atgtgtgcag aaagagccgc cctggaagag ttagttaagt tgcaaggtga acgtgtccgt	60
ggctctgaagc agcagaaggc tagcgcggag ctgatcgaag aagaggtggc caaactgctg	120
aagctgaagg cgcagctggg cccggacgag agcaaacaaa agttcgtcct gaaaaccccg	180
aaa	183

<210> 174
 15 <211> 180
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> HRS con modificación de cisteína que codifica polinucleótido

<400> 174

atggcagaac gtgcggcatt ggaagaattg gttaaactgc aaggtgaacg tgttcgtggt	60
ctgaagcagc agaagtgcag cgcggagctg atcgaagaag aggtggccaa actgctgaag	120
25 ctgaaggcgc agctgggccc ggacgagagc aaacaaaagt tcgtcctgaa aaccccgaaa	180

<210> 175
 <211> 183
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HRS con modificación de cisteína que codifica polinucleótido

35

<400> 175

atggcagaac gtgcggcatt ggaagaattg gttaaactgc aaggtgaacg tgttcgtggt	60
ctgaagcagc agaaggctag cgcggagctg atcgaagaag aggtggccaa actgctgaag	120
ctgaaggcgc agctgggccc ggacgagagc aaacaaaagt tcgtcctgaa aaccccgaaa	180
tgc	183

40 <210> 176
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>

ES 2 652 136 T3

<223> Polipéptido de HRS con mutación de cisteína

<400> 176

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35          40          45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
 50          55          60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
 65          70          75          80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
 85          90          95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100          105          110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115          120          125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130          135          140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145          150          155          160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Ala Asp Phe
165          170          175

Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
180          185          190

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
195          200          205

Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys
210          215          220

Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
225          230          235          240

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

```

ES 2 652 136 T3

Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 450 455 460
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 465 470 475 480
 Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
 485 490 495
 Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu

500

505

5 <210> 177
 <211> 506
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Polipéptido de HRS con mutación de cisteína

<400> 177

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20          25          30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
          50          55          60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65          70          75          80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
          85          90          95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
          100          105          110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
          115          120          125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
          130          135          140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
          145          150          155          160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Val Asp Phe
          165          170          175

Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
          180          185          190

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
          195          200          205

```

ES 2 652 136 T3

Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys
210						215					220				
Gly	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys
225					230					235					240
Leu	Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu
				245					250					255	
Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln
			260					265					270		
Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys
		275					280					285			
Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu
	290					295					300				
Leu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Lys	Ile	Ser	Phe
305					310					315					320
Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Val	Ile	Tyr
				325					330					335	
Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Gln	Ala	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu
			340					345					350		
Gly	Val	Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Arg	Tyr	Asp	Gly	Leu	Val	Gly
		355					360					365			
Met	Phe	Asp	Pro	Lys	Gly	Arg	Lys	Val	Pro	Cys	Val	Gly	Leu	Ser	Ile
	370					375					380				
Gly	Val	Glu	Arg	Ile	Phe	Ser	Ile	Val	Glu	Gln	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu
385					390					395					400
Glu	Glu	Lys	Ile	Arg	Thr	Thr	Glu	Thr	Gln	Val	Leu	Val	Ala	Ser	Ala
				405					410					415	
Gln	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Trp
			420					425					430		
Asp	Ala	Gly	Ile	Lys	Ala	Glu	Leu	Leu	Tyr	Lys	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu
		435					440					445			
Leu	Asn	Gln	Leu	Gln	Tyr	Cys	Glu	Glu	Ala	Gly	Ile	Pro	Leu	Val	Ala

ES 2 652 136 T3

450

455

460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
500 505

<210> 178

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de HRS con mutación de cisteína

<400> 178

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130 135 140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145 150 155 160

ES 2 652 136 T3

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
 165 170 175
 Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Ala Leu
 180 185 190
 Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
 195 200 205
 Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys
 210 215 220
 Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
 245 250 255
 Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala

ES 2 652 136 T3

405

410

415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
500 505

<210> 179

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de HRS con mutación de cisteína

<400> 179

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

ES 2 652 136 T3

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

ES 2 652 136 T3

355	360	365
Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile		
370	375	380
Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu		
385	390	395
Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala		
	405	410
Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp		
	420	425
Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu		
	435	440
Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala		
	450	455
Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser		
465	470	475
Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu		
	485	490
Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu		
	500	505

<210> 180

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de HRS con mutación de cisteína

<400> 180

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45
Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
50 55 60

ES 2 652 136 T3

Tyr	Ser	Pro	Arg	Gln	Met	Ala	Val	Arg	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	Val	Ile	65	70	75	80
Ile	Arg	Cys	Phe	Lys	Arg	His	Gly	Ala	Glu	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Val	85	90	95	
Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Lys	Tyr	Gly	Glu	Asp	Ser	Lys	100	105	110	
Leu	Ile	Tyr	Asp	Leu	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Arg	115	120	125	
Tyr	Asp	Leu	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Leu	130	135	140	
Thr	Asn	Ile	Lys	Arg	Tyr	His	Ile	Ala	Lys	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Asn	145	150	155	160
Pro	Ala	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gln	Cys	Asp	Phe	165	170	175	
Asp	Ile	Ala	Gly	Asn	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Val	Leu	180	185	190	
Lys	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	195	200	205	
Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	210	215	220	
Gly	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	225	230	235	240
Leu	Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu	245	250	255	
Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln	260	265	270	
Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys	275	280	285	
Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	290	295	300	
Leu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Lys	Ile	Ser	Phe				

ES 2 652 136 T3

```

305                               310                               315                               320

Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
      325                               330                               335

Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
      340                               345                               350

Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
      355                               360                               365

Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
      370                               375                               380

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
385                               390                               395                               400

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
      405                               410                               415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
      420                               425                               430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
      435                               440                               445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450                               455                               460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465                               470                               475                               480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
      485                               490                               495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
      500                               505

```

<210> 181

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido de HRS con mutación de cisteína

<400> 181

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1      5      10      15

```

ES 2 652 136 T3

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

ES 2 652 136 T3

260	265	270
Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys		
275	280	285
Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu		
290	295	300
Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe		
305	310	315
Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr		
325	330	335
Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu		
340	345	350
Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly		
355	360	365
Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile		
370	375	380
Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu		
385	390	395
Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala		
405	410	415
Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp		
420	425	430
Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu		
435	440	445
Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala		
450	455	460
Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser		
465	470	475
Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu		
485	490	495
Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu		
500	505	

<210> 182

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 652 136 T3

<220>

<223> Polipéptido de HRS con mutación de cisteína

5 <400> 182

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1              5              10              15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
          20              25              30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35              40              45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
 50              55              60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
 65              70              75              80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
          85              90              95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
          100              105              110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
          115              120              125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
          130              135              140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
          145              150              155              160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
          165              170              175

Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
          180              185              190

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
          195              200              205

Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys

```

ES 2 652 136 T3

210		215		220
Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Ser Ser Ser Val Asp Lys				
225		230		235
Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu				
	245		250	255
Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln				
	260		265	270
Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys				
	275		280	285
Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu				
	290		295	300
Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe				
305		310		315
Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr				
	325		330	335
Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu				
	340		345	350
Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly				
	355		360	365
Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile				
	370		375	380
Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu				
385		390		395
Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala				
	405		410	415
Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp				
	420		425	430
Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu				
	435		440	445
Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala				
	450		455	460

ES 2 652 136 T3

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
500 505

<210> 183

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de HRS con mutación de cisteína que codifica polinucleótido

<400> 183

atggcggaac	gtgccgcact	ggaagaattg	gttaaattac	agggagaacg	cgtacgtggt	60
cttaacaac	aaaaagcctc	tgccgaattg	attgaagaag	aagttgcaa	attactgaaa	120
ctgaaagctc	aacttggacc	cgatgaaagt	aaacaaaaat	ttgtgttgaa	aacgccccaa	180
ggaaccctg	attatagtcc	acgtcaaagt	gccgttcgtg	aaaaagtgtt	cgacgttatt	240
attcgtgtt	ttaaactgca	cgggtgctgaa	gtaatcgata	ccccgtatt	tgaattgaaa	300
gagactctga	tgggcaaata	tggtgaagat	tctaaactga	tttatgattt	gaaagaccaa	360
ggaggtgaac	tgctgagcct	gcgctacgac	ttaactgtgc	cttttgcccg	ttacttagcc	420
atgaataaat	taaccaacat	caaacgttac	catattgcaa	aagtatatcg	ccgcgacaac	480
cctgcaatga	ctcgtggacg	ctatcgcgaa	ttctatcagg	ctgattttga	tattgccgga	540
aatttcgacc	cgatgatccc	ggatgccgag	tgtttgaaaa	ttatgtgtga	aattctgagt	600
tcgttcgaga	tcggagactt	tcttgtaaaa	gttaatgacc	gccgtattct	ggatggtatg	660
tttgctattt	gcggtgtttc	tgattccaaa	ttccgtacaa	tctgctcaag	cgtggacaaa	720
ttggataaag	tgtcttgga	agaagtaaaa	aatgaaatgg	tgggagaaaa	aggcctggct	780
ccagaagtag	cagaccgtat	tggtgactat	gttcaacaac	atggcggtgt	gtccttagtc	840
gaacagttat	tacaggatcc	taaactgagc	caaaataaac	aagcacttga	aggactggga	900
gatctgaaat	tactctttga	atatctgacc	ttatttgga	ttgatgataa	aattagcttt	960
gatctgagct	tggcccgcg	tcttgattat	tataccggcg	tgatttacga	agctgttctc	1020
ttgcaaacc	cagcccaggc	gggcgaagag	cctttgggag	tcggcagtg	ggcagccggt	1080
ggtcgttatg	atggttttgt	aggaatgttt	gaccctaaag	gccgtaaagt	accatgtgtg	1140
gggctttcta	tcggtgtcga	acgtatcttt	tctattgttg	aacaacgtct	tgaagctttg	1200
gaggaaaaga	tccgtaccac	ggaaacccaa	gtcttagttg	caagtgccca	aaaaaaactg	1260

ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg	1320
ctgtataaaa agaaccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggac	1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa ttaaaagatg gcgtgattaa actgcgttca	1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc	1500
cgcaccggtc aaccgtta	1518

<210> 184

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de HRS con mutación de cisteína que codifica polinucleótido

<400> 184

atggcggaaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt	60
cttaacaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgcaa attactgaaa	120
ctgaaagctc aacttgacc cgatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgccccaa	180
ggaaccctg attatagtcc acgtcaaag ggcgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt	240
attcgtgtt ttaaacgtca cgggtctgaa gtaatcgata ccccggtatt tgaattgaaa	300
gagactctga tgggcaaata tgggtgaagt tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa	360
ggaggtgaac tgctgagcct gcgctacgac ttaactgtgc cttttgcccg ttacttagcc	420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac	480
cctgcaatga ctcgtagacg ctatcgcgaa ttctatcagg ttgattttga tattgccgga	540
aatttcgacc cgatgatccc ggatgccgag tgtttgaaaa ttatgtgtga aattctgagt	600
tcgttcgaga tcggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatggtatg	660
tttgcatttt gcggtgtttc tgattccaaa ttccgtacaa tctgctcaag cgtggacaaa	720
ttggataaag tgtcttgga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct	780
ccagaagtag cagaccgtat tgggtgactat gttcaacaac atggcggtgt gtccttagtc	840
gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaaataaac aagcacttga aggactggga	900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttggga ttgatgataa aattagcttt	960
gatctgagct tggcccgcg tcttgattat tataccggcg tgatttacga agctgttctc	1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag cctttgggag tcggcagtggt ggcagccggt	1080
ggtcgttatg atggtttggt aggaatgttt gaccctaaag gccgtaaagt accatgtgtg	1140
gggctttcta tcggtgtcga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg	1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaccacaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaactg	1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg	1320

ES 2 652 136 T3

ctgtataaaa agaaccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggac	1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa ttaaagatg gcgtgattaa actgcgttca	1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc	1500
cgcaccgggc aaccgtta	1518

<210> 185

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de HRS con mutación de cisteína que codifica polinucleótido

<400> 185

atggcggaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt	60
cttaacaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgcaa attactgaaa	120
ctgaaagctc aacttgacc cgtatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgccccaa	180
ggaaccctg attatagtcc acgtcaaagc gccgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt	240
attcgtctgtt ttaaacgtca cgggtgctgaa gtaatcgata ccccggtatt tgaattgaaa	300
gagactctga tgggcaataa tgggtgaagat tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa	360
ggaggtgaac tgctgagcct gcgctacgac ttaactgtgc cttttgcccg ttacttagcc	420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac	480
cctgcaatga ctctgagcgt ctatcgcgaa ttctatcagt gtgattttga tattgcccga	540
aatttcgacc cgtatgatccc ggatgccgag gctttgaaaa ttatgtgtga aattctgagt	600
tcgttgacga tcggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatggatg	660
tttgctattt gcggtgtttc tgattccaaa ttccgtacaa tctgctcaag cgtggacaaa	720
ttggataaag tgtcttgga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct	780
ccagaagtag cagaccgtat tgggtactat gttcaacaac atggcggtgt gtccttagtc	840
gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaataaac aagcacttga aggactggga	900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttggga ttgatgataa aattagcttt	960
gatctgagct tggcccgcgg tcttgattat tataccggcg tgatttacga agctgttctc	1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag cctttgggag tcggcagtggt ggcagccggt	1080
ggtcgttatg atggtttggt aggaatgttt gaccctaaag gccgtaaagt accatgtgtg	1140
gggctttcta tcggtgtcga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg	1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaacccaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaactg	1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg	1320

ES 2 652 136 T3

ctgtataaaa agaaccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggac	1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa ttaaagatg gcgtgattaa actgcgttca	1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc	1500
cgcaccgggc aaccgtta	1518

<210> 186

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de HRS con mutación de cisteína que codifica polinucleótido

<400> 186

atggcggaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt	60
cttaacaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgcaa attactgaaa	120
ctgaaagctc aacttgacc cgtatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgccccaa	180
ggaaccctg attatagtcc acgtcaaatg gccgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt	240
attcgtgtgtt ttaaacgtca cgggtgctgaa gtaatcgata ccccggtatt tgaattgaaa	300
gagactctga tgggcaataa tgggtgaagat tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa	360
ggaggtgaac tgctgagcct gcgctacgac ttaactgtgc cttttgcccg ttacttagcc	420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac	480
cctgcaatga ctctgagcgt ctatcgcgaa ttctatcagt gtgattttga tattgccgga	540
aatttcgacc cgtatgatccc ggatgccgag agtttgaaaa ttatgtgtga aattctgagt	600
tcgttgacga tcgggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatggatg	660
tttgctattt gcggtgtttc tgattccaaa ttccgtacaa tctgctcaag cgtggacaaa	720
ttggataaag tgtcttgga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct	780
ccagaagtag cagaccgtat tgggtgactat gttcaacaac atggcggtgt gtccttagtc	840
gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaataaac aagcacttga aggactggga	900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttggga ttgatgataa aattagcttt	960
gatctgagct tggcccgcg tcttgattat tataccggcg tgatttacga agctgttctc	1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag cttttgggag tcggcagtgt ggcagccggt	1080
ggcgttatg atggtttggt aggaatgttt gaccctaaag gccgtaaagt accatgtgtg	1140
gggctttcta tcggtgtcga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg	1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaccccaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaactg	1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg	1320
ctgtataaaa agaaccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggac	1380

15

ES 2 652 136 T3

ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa ttaaaagatg gcgtgattaa actgcgttca	1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc	1500
cgcaccggtc aaccgtta	1518

<210> 187

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de HRS con mutación de cisteína que codifica polinucleótido

<400> 187

atggcggaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt	60
cttaacaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgccaa attactgaaa	120
ctgaaagctc aacttgacc cgatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgccc aaa	180
ggaaccctg attatagtcc acgtcaaatg gccgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt	240
attcgtgtt ttaaacgtca cgggtgtgaa gtaatcgata ccccggtatt tgaattgaaa	300
gagactctga tgggcaaata tgggtgaagat tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa	360
ggaggtgaac tgctgagcct ggcgtacgac ttaactgtgc cttttgccg ttacttagcc	420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac	480
cctgcaatga ctogtgacg ctatcgcgaa ttctatcagt gtgattttga tattgccgga	540
aatttcgacc cgatgatccc ggatgccgag gttttgaaa ttatgtgtga aattctgagt	600
tcgtgcaga tcggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatggtatg	660
tttgcatttt gcggtgtttc tgattccaaa ttccgtacaa tctgctcaag cgtggacaaa	720
ttggataaag tgtcttgga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct	780
ccagaagtag cagaccgtat tgggtgactat gttcaacaac atggcgggtg gtccttagtc	840
gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaaataaac aagcacttga aggactggga	900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttgga ttgatgataa aattagcttt	960
gatctgagct tggccgcggt tcttgattat tataccggcg tgatttacga agctgttctc	1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag cctttgggag tcggcagtggt ggcagccggt	1080
ggtcgttatg atggtttggt aggaatgtt gaccctaaag gccgtaaagt accatgtgtg	1140
gggctttcta tcggtgtcga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg	1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaacccaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaactg	1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg	1320
ctgtataaaa agaaccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggatc	1380

ES 2 652 136 T3

ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa ttaaaagatg gcgtgattaa actgcgttca	1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc	1500
cgcaccggtc aaccgtta	1518

<210> 188

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de HRS con mutación de cisteína que codifica polinucleótido

<400> 188

atggcggaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt	60
cttaacaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgccaa attactgaaa	120
ctgaaagctc aacttgacc cgatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgcccaca	180
ggaaccctg attatagtcc acgtcaaag ggcgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt	240
attcgtgtt ttaaacgtca cgggtgtgaa gtaatcgata ccccggtatt tgaattgaaa	300
gagactctga tgggcaaata tgggtgaagat tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa	360
ggaggtgaac tgctgagcct ggcgtacgac ttaactgtgc cttttgccg ttacttagcc	420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac	480
cctgcaatga ctogtgacg ctatcgcgaa ttctatcagt gtgattttga tattgccgga	540
aatttcgacc cgatgatccc ggatgccgag tgtttgaaa ttatgtgtga aattctgagt	600
tcgttcgaga tcggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatggtatg	660
tttgcatttt ccggtgtttc tgattccaaa ttccgtacaa tctgctcaag cgtggacaaa	720
ttggataaag tgtcttgga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct	780
ccagaagtag cagaccgtat tgggtgactat gttcaacaac atggcggtgt gtccttagtc	840
gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaaataaac aagcacttga aggactggga	900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttgga ttgatgataa aattagcttt	960
gatctgagct tggccgcggt tcttgattat tataccggcg tgatttacga agctgttctc	1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag cctttgggag tcggcagtggt ggcagccggt	1080
ggtcgttatg atggttttgt aggaatgtt gaccctaaag gccgtaaagt accatgtgtg	1140
gggctttcta tcggtgtcga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg	1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaccccaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaactg	1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg	1320
ctgtataaaa agaaccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggatc	1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa ttaaaagatg gcgtgattaa actgcgttca	1440

gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc 1500
cgcaccggtc aaccgtta 1518

<210> 189

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de HRS con mutación de cisteína que codifica polinucleótido

<400> 189

atggcggaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt 60
cttaaacacac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgccaa attactgaaa 120
ctgaaagctc aacttggacc c gatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgccccaa 180
ggaaccctg attatagtcc acgtcaaagt gccgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt 240
attcgtgtt ttaaacgtca cgggtgctgaa gtaatcgata cccccgtatt tgaattgaaa 300
gagactctga tgggcaaata tggatgaagt tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa 360
ggaggtgaac tgctgagcct gcgctacgac ttaactgtgc cttttgcccg ttacttagcc 420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac 480
cctgcaatga ctctgagcgt ctatcgcgaa tctatcaggt gtgattttga tattgccgga 540
aatttcgacc c gatgatccc ggatgccgag tgtttgaaaa ttatgtgtga aattctgagt 600
tcgttgcaga tcggagactt tcttgtaaaa gtaaatgacc gccgtattct ggatggtatg 660
tttgcatttt gcggtgtttc tgattccaaa ttccgtacaa tctcctcaag cgtggacaaa 720
ttggataaag tgtcttggga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct 780
ccagaagtag cagaccgtat tggatgactat gttcaacaac atggcggtgt gtccttagtc 840
gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaataaac aagcacttga aggactggga 900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttggga ttgatgataa aattagcttt 960
gatctgagct tggcccgcgg tcttgattat tataccggcg tgatttacga agctgttctc 1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag ctttgggag tcggcagtggt ggcagccggt 1080
ggcgtttatg atggtttggt aggaatgttt gaccctaaag gccgtaaagt accatgtgtg 1140
gggctttcta tcggtgtcga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg 1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaacccaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaactg 1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg 1320
ctgtataaaa agaaccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggatc 1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa taaaagatg gcgtgattaa actgcgttca 1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc 1500
cgcaccggtc aaccgtta 1518

15

ES 2 652 136 T3

<210> 190
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 190

	Val	Phe	Asp	Val	Ile	Ile	Arg	Cys	Phe	Lys
	1				5					10

10 <210> 191
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 191

	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Asn	Pro	Ala	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu
	1				5					10					15	

	Phe	Tyr	Gln	Cys	Asp	Phe	Asp	Ile	Ala	Gly	Asn	Phe	Asp	Pro	Met	Ile
				20					25					30		

	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu	Lys
				35			

20 <210> 192
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 192

	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	Val
	1				5					10					15	

Lys

<210> 193
 30 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 193

35

	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	Gly	Val
	1				5					10					15	

	Ser	Asp	Ser	Lys
				20

<210> 194
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 194

ES 2 652 136 T3

```

Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
1          5          10

<210> 195
<211> 13
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 195

Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys
10          1          5          10

<210> 196
<211> 27
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 196

Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile
1          5          10          15

Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys
20          25

20 <210> 197
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 197

Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val
1          5          10          15

Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys
20          25

30 <210> 198
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 198

Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
1          5          10

<210> 199
40 <211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 199

50 gtttgacgta atcatccgtt gcttcaagcg ccacgggtgcag          41

```

<210> 200
 <211> 41
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>

 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína
 10
 <400> 200

 ctgcaccgtg gcgcttgaag caacggatga ttacgtcaaa c 41

 15 <210> 201
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>

 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

 <400> 201
 25
 gccgataccg ggaattctac cagtgtgatt ttgacattgc tggg 44

 <210> 202
 <211> 44
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>

 35 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

 <400> 202

 cccagcaatg tcaaaatcac actggtagaa ttcccggtat cggc 44
 40
 <210> 203
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>

 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

 50 <400> 203

 ccatgatccc tgaatgcagag tgctgaaga tcatgtgcga g 41

 <210> 204
 55 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60
 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 204

ctcgacatg atcttcaggc actctgcatc agggatcatg g 41

5 <210> 205
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

15 <400> 205

gcagagtgcc tgaagatcat gtgcgagatc ctgagttcac ttc 43

20 <210> 206
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 206

30 gaagtgaact caggatctcg cacatgatct tcaggcactc tgc 43

<210> 207
<211> 45
<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

40 <400> 207

ctagatggga tgttgctat ctgtggtgtt tctgacagca agttc 45

45 <210> 208
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 208

55 gaacttgctg tcagaaacac cacagatagc aaacatccca tctag 45

<210> 209
<211> 41

60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

5 <400> 209

cagcaagttc cgtaccatct gctcctcagt agacaagctg g 41

10 <210> 210
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 210

20 ccagcttgct tactgaggag cagatggtac ggaacttgct g 41

<210> 211
 <211> 37

25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 211

gggcgcaagg tgccatgtgt ggggctcagc attgggg 37

35 <210> 212
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

45 <400> 212

ccccaatgct gagccccaca catggcacct tgcgccc 37

<210> 213

50 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 213

60 ctgaaccagt tacagtactg tgaggaggca ggcacccc 38

<210> 214
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína
 10 <400> 214
 gggatgcctg cctcctcaca gtactgtaac tgggtcag 38
 <210> 215
 15 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína
 <400> 215
 25 gagaacaggc cagcccctct gcatctgcta gaaccacgc 39
 <210> 216
 <211> 39
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína
 35 <400> 216
 gctgggttct agcagatgca gaggggctgg cctgttctc 39
 40 <210> 217
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína
 <400> 217
 50 ccagcccctc tgcactgct agaaccacgc ttcttg 37
 <210> 218
 <211> 37
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 218

caagaaagct gggttctagc agatgcagag gggctgg 37

5 <210> 219

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 219

15

gaacaggcca gccctctag aaccagctt tcttg 35

<210> 220

<211> 35

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 220

caagaaagct gggttctaga ggggctggcc tgttc 35

30

<210> 221

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

40 <400> 221

cccggatgcc gaggcttga aaattatgtg 30

<210> 222

45 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 222

55 cacataatt tcaaagcctc ggcacccggg 30

<210> 223

<211> 35

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

5 <400> 223

gatcccgat gccgagagtt tgaaaattat gtgtg 35

<210> 224

10 <211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 224

20 cacacataat ttcaaactc tcggcatccg ggatc 35

<210> 225

<211> 35

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

30

<400> 225

gatcccgat gccgaggtt tgaaaattat gtgtg 35

35 <210> 226

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 226

45

cacacataat ttcaaaacc tcggcatccg ggatc 35

<210> 227

<211> 35

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 227

cgcaattct atcaggctga tttgatatt gccgg 35

60

<210> 228

<211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 228

10 ccggcaatat caaaatcagc ctgatagaat tcgcg 35

<210> 229

<211> 34

15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 229

cgcggaattct atcaggttga tttgatatt gccg 34

25

<210> 230

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

35 <400> 230

cggaatatc aaaatcaacc tgatagaatt cgcg 34

<210> 231

40 <211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 231

50 ggtatgttg ctattccgg tgttctgat tcc 33

<210> 232

<211> 33

<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

60

<400> 232

ggaatcagaa acaccgaaa tagcaaaccat acc 33

<210> 233
5 <211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 233

15 ccaaattccg tacaatctcc tcaagcgtgg acaaattgg 39

<210> 234
<211> 39
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

25 <400> 234

ccaatttgtc cacgcttgag gagattgtac ggaatttgg 39

30 <210> 235
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 235

40 cccggatgcc gaggcttga aaattatgtg 30

<210> 236
<211> 30
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Cebador para mutar selectivamente un residuo de cisteína

<400> 236

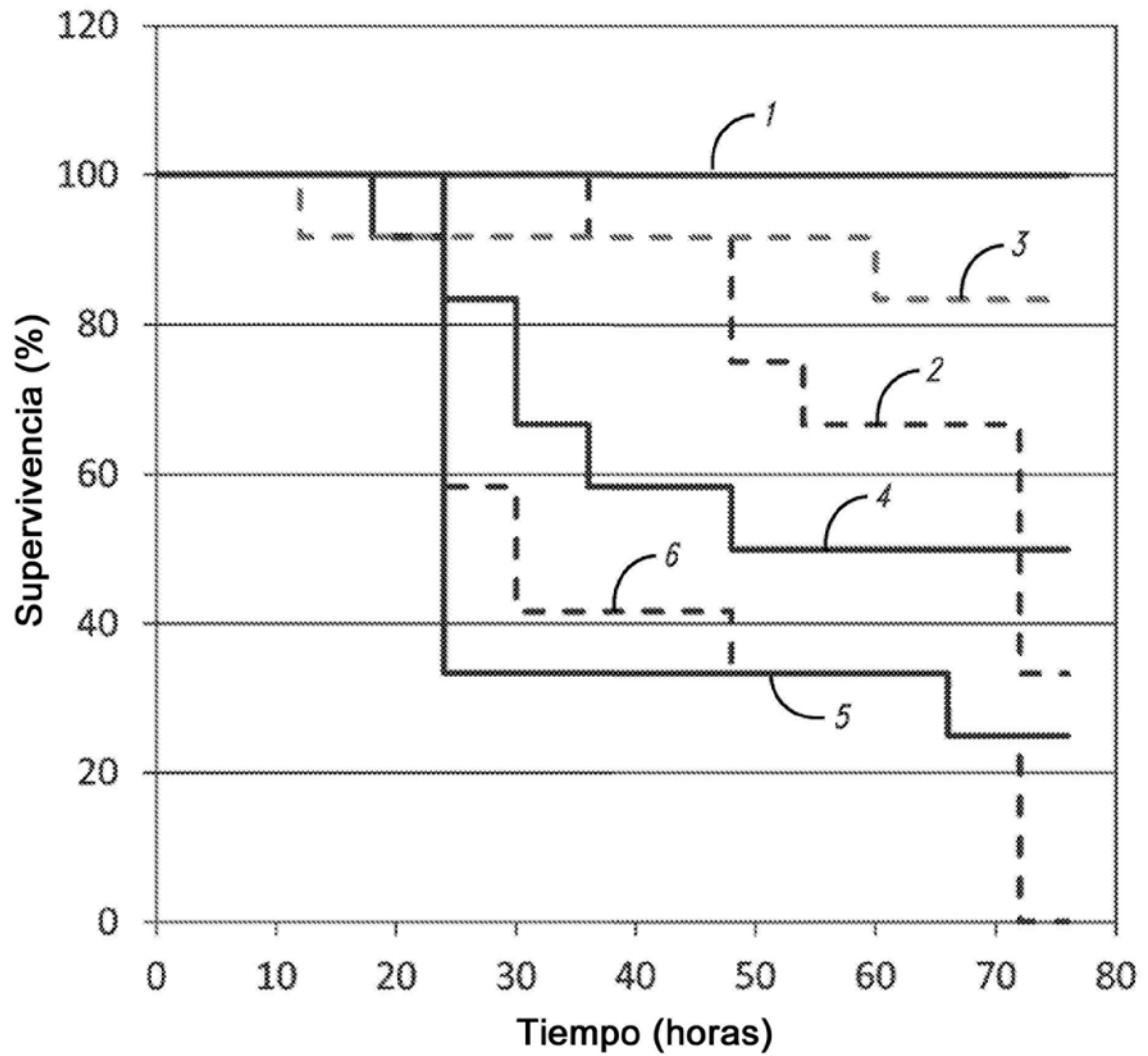
cacataattt tcaaagcctc ggcatccggg 30

55

REIVINDICACIONES

1. Una composición terapéutica, que comprende un polipéptido de histidil-tRNA sintetasa (HRS) de 500-506 aminoácidos de longitud que es idéntico en al menos el 90% a la SEQ ID NO: 70 y carece de los residuos 507-509 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo que experimenta una reacción cruzada específicamente con un autoanticuerpo específico para histidil-tRNA sintetasa, o posee una actividad antiinflamatoria, y donde la composición/polipéptido de HRS: a) es al menos aproximadamente del 95% de pureza; b) está agregada en menos de aproximadamente el 5%; y c) está sustancialmente libre de endotoxinas.
2. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido de HRS tiene 505-506 aminoácidos de longitud y es idéntico en al menos el 90% a la SEQ ID NO: 70.
3. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido de HRS comprende la SEQ ID NO: 70.
4. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido de HRS consiste en la SEQ ID NO: 70.
5. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido de HRS comprende la SEQ ID NO: 166.
6. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido de HRS consiste en la SEQ ID NO: 166.
7. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido de HRS tiene una mutación de al menos un residuo de cisteína.
8. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 7, donde el al menos un residuo de cisteína se selecciona de entre Cys174, Cys191, Cys224, Cys235 y Cys455.
9. La composición terapéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el polipéptido de HRS tiene actividad biológica y/u homogeneidad incrementadas con respecto a un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 en condiciones comparables, comprendidas entre aproximadamente 4-40°C, y un pH de aproximadamente 6,0-8,0.
10. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 9, donde el polipéptido de HRS tiene una formación de disulfuro intercadena reducida en condiciones reducidas con respecto al polipéptido de la SEQ ID NO: 1.
11. Una composición terapéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en:
 - a) el tratamiento de una distrofia muscular;
 - b) el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria;
 - c) el tratamiento de rabdomiólisis, degeneración muscular, caquexia, inflamación muscular o lesión muscular; o
 - d) el tratamiento de una enfermedad asociada con un autoanticuerpo específico para histidil-tRNA sintetasa, donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo que experimenta una reacción cruzada específicamente con el autoanticuerpo, y donde el autoanticuerpo es un anticuerpo anti-Jo-1.
12. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 11 (a), donde la distrofia muscular se selecciona de entre distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular de cinturas y miembros, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia miotónica, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular distal y distrofia muscular congénita.
13. La composición terapéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde la distrofia muscular es distrofia muscular facioescapulohumeral.
14. La composición terapéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, donde la distrofia muscular facioescapulohumeral es de inicio en la lactancia o la infancia.

15. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 11 (d), donde la enfermedad se selecciona de entre el grupo que consiste en miopatías inflamatorias, que incluye polimiositis, dermatomiositis y trastornos relacionados, solapamiento de polimiositis-esclerodermia, miositis de cuerpos de inclusión (MCI),
5 síndrome anti-sintetasa, enfermedad pulmonar intersticial, artritis y fenómeno de Raynaud.
16. Una composición inmunoabsorbente que comprende un soporte sólido biocompatible que tiene unido al mismo al menos un polipéptido de histidil-tRNA sintetasa (HRS) tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo que experimenta una reacción
10 cruzada específicamente con un autoanticuerpo específico para histidil-tRNA sintetasa.
17. La composición inmunoabsorbente de acuerdo con la reivindicación 16, donde el polipéptido de HRS se selecciona de entre SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 166.
- 15 18. La composición inmunoabsorbente de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17, donde el soporte sólido biocompatible se selecciona de entre polímeros naturales y sintéticos, polisacáridos, poliamidas, perlas de vidrio, sílice en partículas, vidrio poroso, sílice, resinas y matrices sintéticas que incluyen derivados de acrilamida, derivados de metacrilamida y derivados de poliestireno.
- 20 19. La composición inmunoabsorbente de acuerdo con la reivindicación 18, donde el polímero se selecciona de entre agar, alginato, carragenano, goma guar, goma arábica, goma ghatti, goma de tragacanto, goma de karaya, goma garrofín, goma de xantano, agarosas, celulosas, pectinas, mucinas, dextranos, almidones, heparinas, quitosanos, almidones hidroxilados, almidones de hidroxipropilo, almidones de carboximetilo, hidroxietilcelulosas, hidroxipropilcelulosas y carboximetilcelulosas.
25
20. La composición inmunoabsorbente de acuerdo con la reivindicación 18, donde el polímero sintético se selecciona de entre polímeros acrílicos, poliamidas, poliimidas, poliésteres, poliéteres, compuestos poliméricos de vinilo, polialquenos y mezclas de los mismos.
- 30 21. La composición inmunoabsorbente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, donde el polipéptido de HRS está acoplado de forma covalente al soporte biocompatible
22. Un procedimiento para inmunoabsorción extracorpórea de anticuerpos de anti-histidil-tRNA sintetasa (HRS) a partir de un fluido corporal extracelular, que comprende (a) el suministro del fluido corporal extracelular que
35 se ha obtenido de un sujeto, (b) la puesta en contacto del fluido corporal extracelular con un soporte sólido biocompatible que tiene al menos un polipéptido de HRS tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 unido al mismo, capturando así los anticuerpos anti-HRS en el soporte sólido.
23. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, donde los anticuerpos anti-HRS incluyen un
40 anticuerpo Jo-1.
24. El polipéptido de HRS tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un procedimiento para inmunoabsorción extracorpórea de anticuerpos de anti-histidil-tRNA sintetasa (HRS) a partir de un fluido corporal extracelular, que comprende (a) el suministro del fluido corporal extracelular que se ha obtenido
45 de un sujeto, (b) la puesta en contacto del fluido corporal extracelular con un soporte sólido biocompatible que tiene el polipéptido de HRS unido al mismo, capturando así los anticuerpos anti-HRS en el soporte sólido, y (c) la reinfusión del fluido corporal extracelular de la etapa (b) en el sujeto.
25. El polipéptido de HRS para su uso de acuerdo con la reivindicación 24, para su uso inmediatamente
50 antes de la administración de un polipéptido de HRS.



- | | |
|--------------------------------|--------------------------|
| 1= ——— No tratado | 4= ——— TNBS sólo |
| 2= - - - TNBS + Resokine 5 mpk | 5= ——— TNBS + budesonida |
| 3= - - - TNBS + Resokine 1 mpk | 6= - - - TNBS + PBS |

FIG. 1

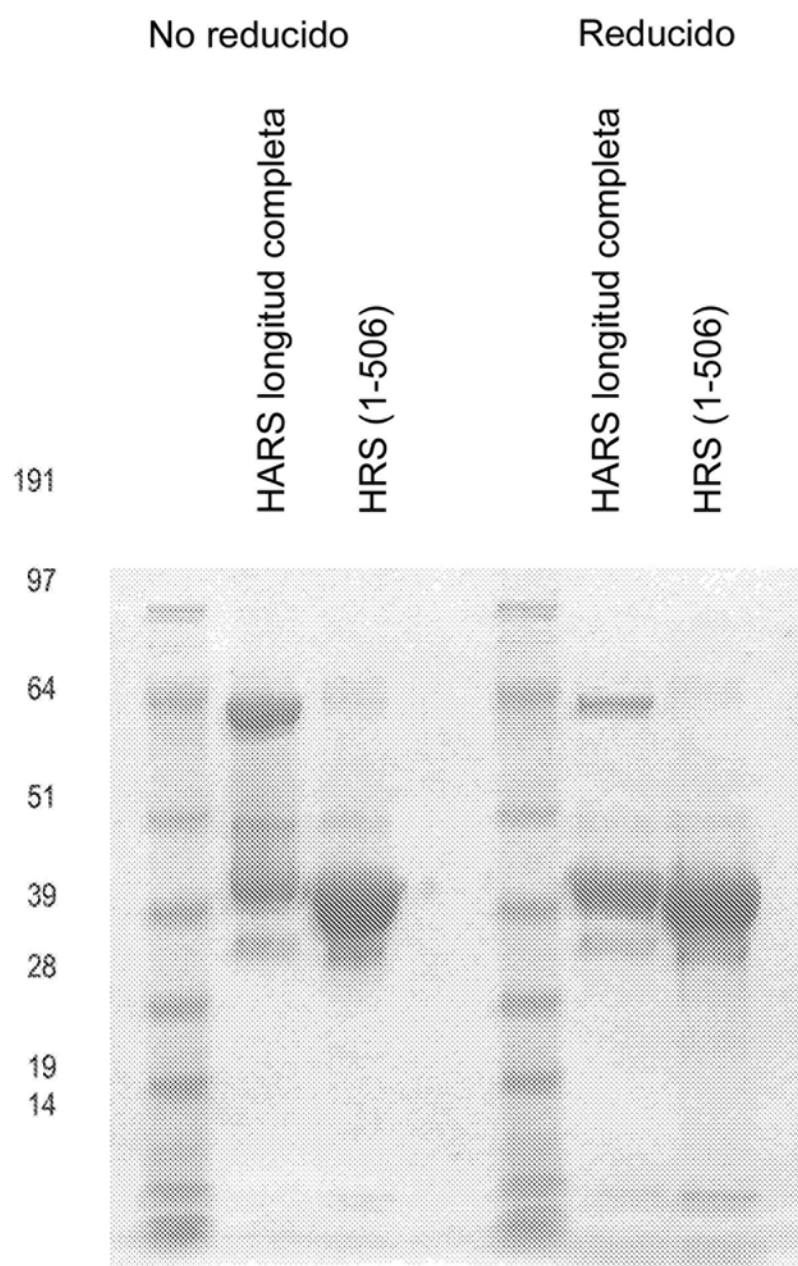
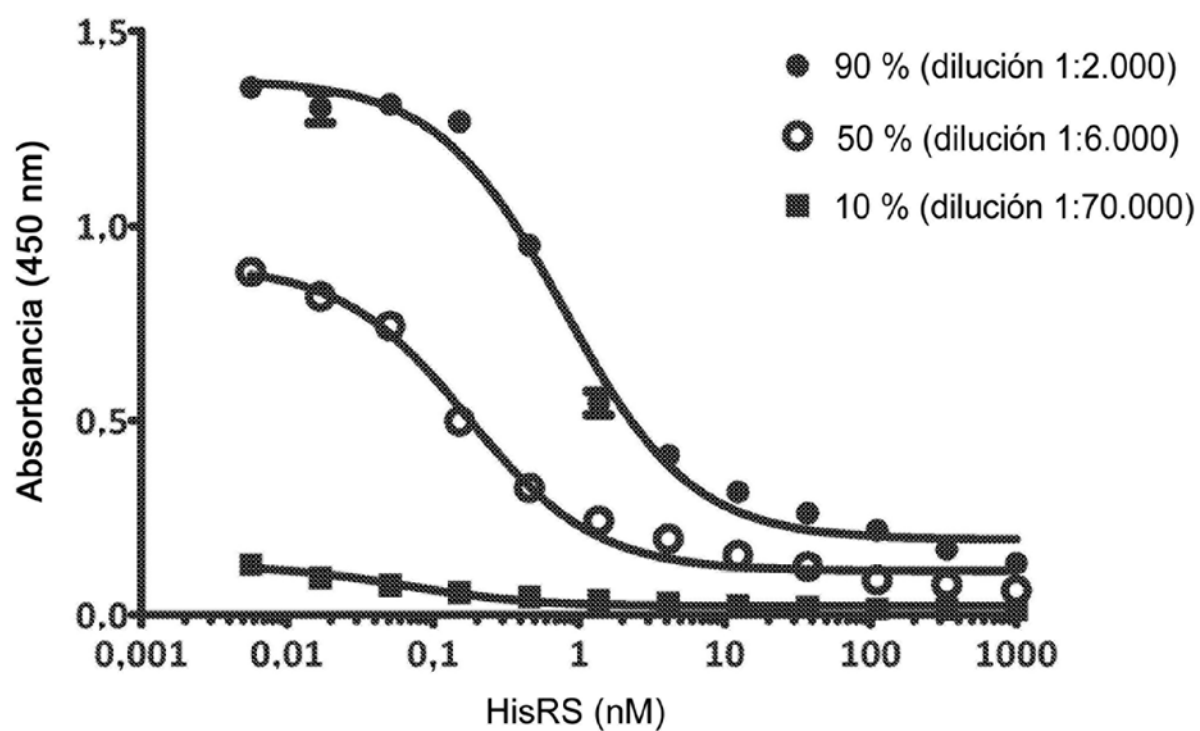
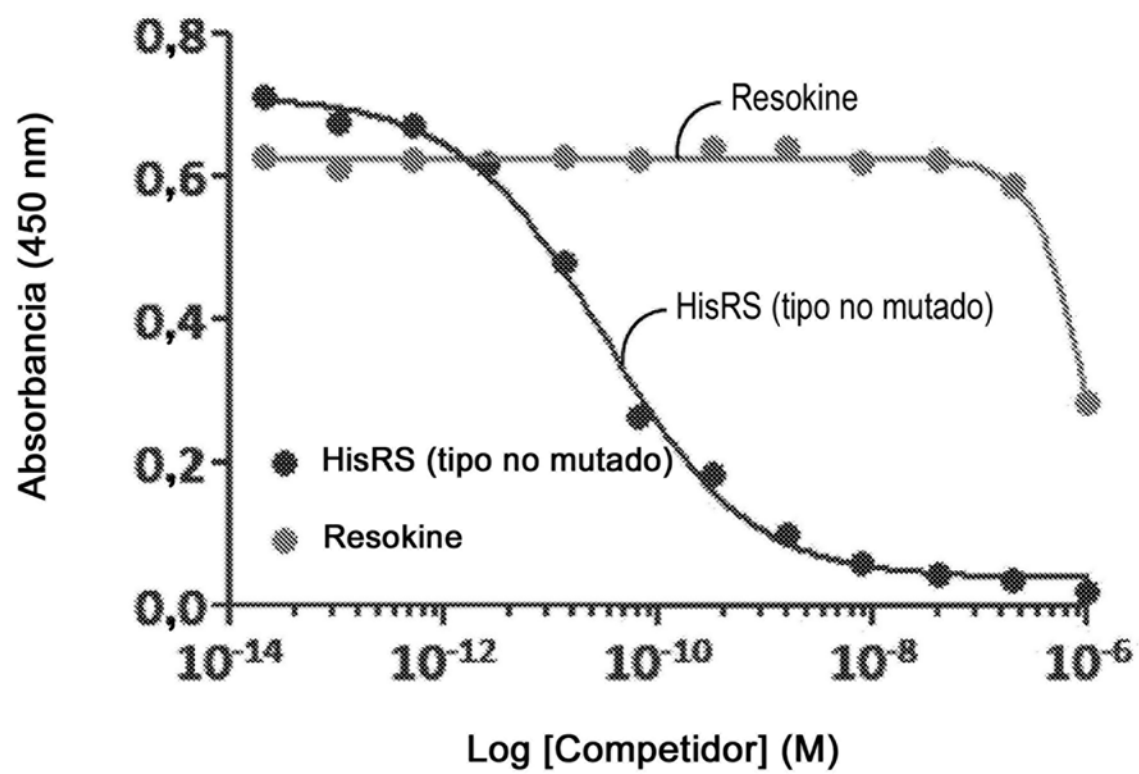
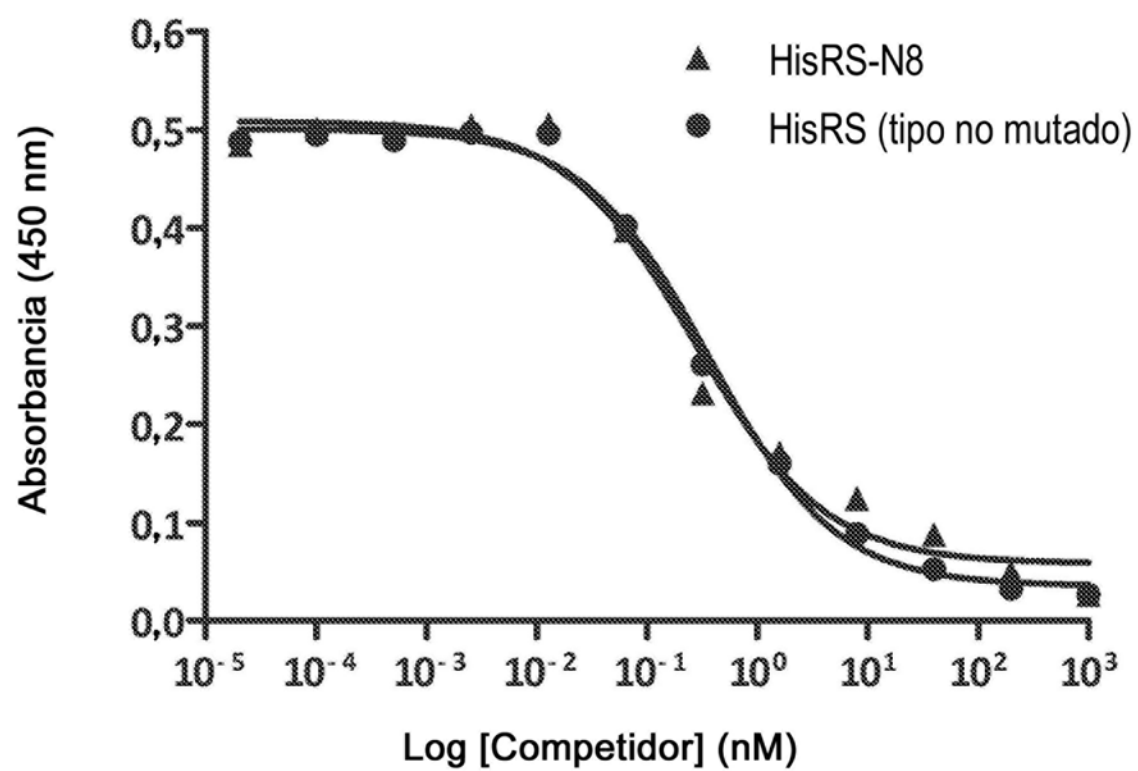
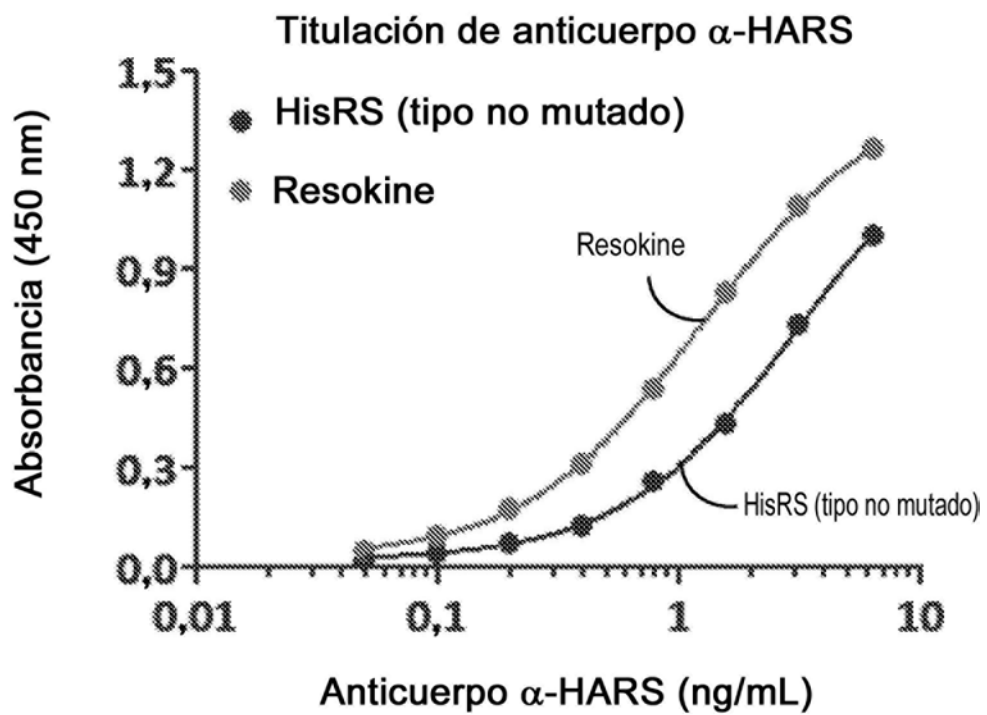


FIG. 2

*FIG. 3*

*FIG. 4*

*FIG. 5*

*FIG. 6*

HisRS-SV o fragmentos

Recombinante (C-His)
1-506
1-60, 399-506
1-60
54-506
54-410
405-506
1-410

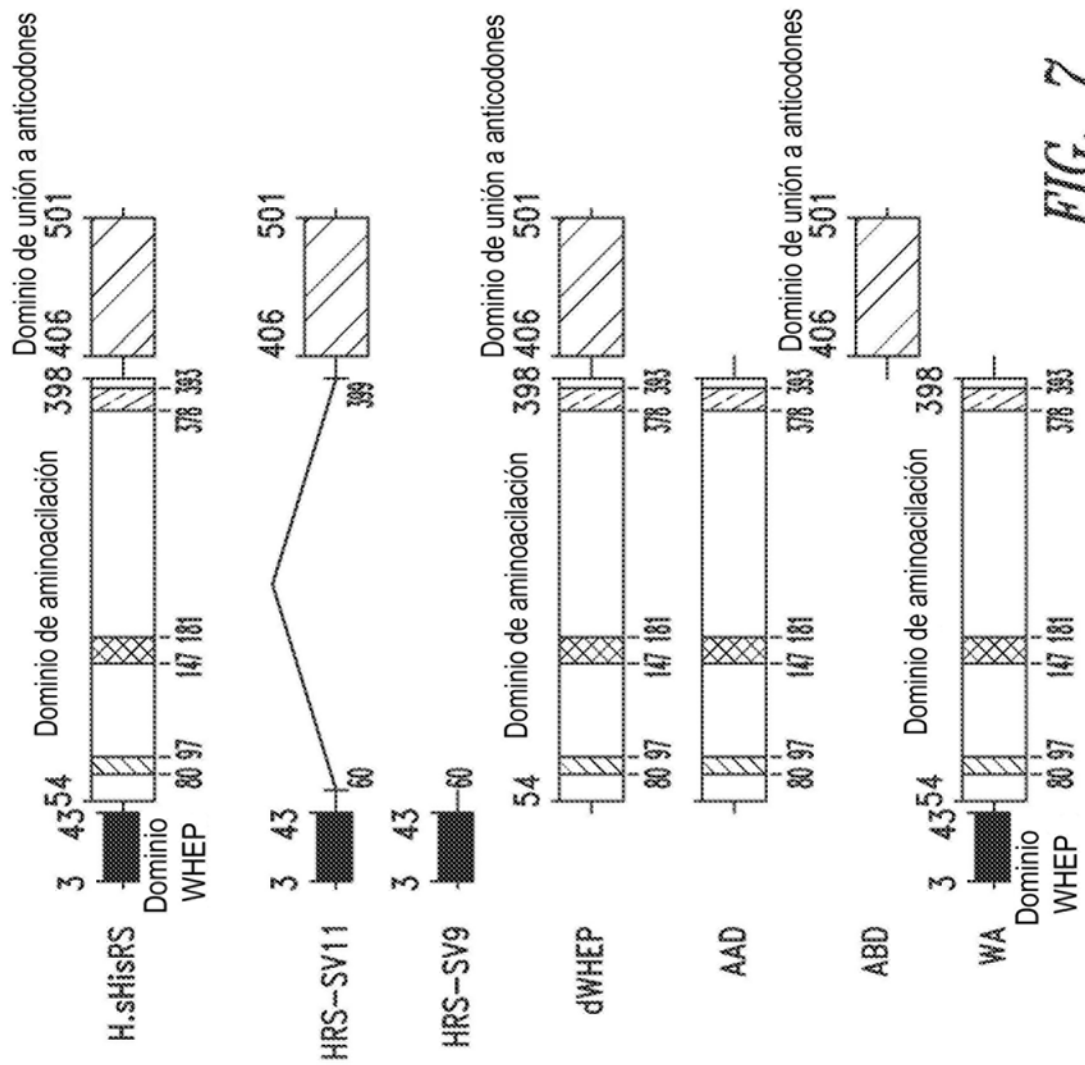


FIG. 7

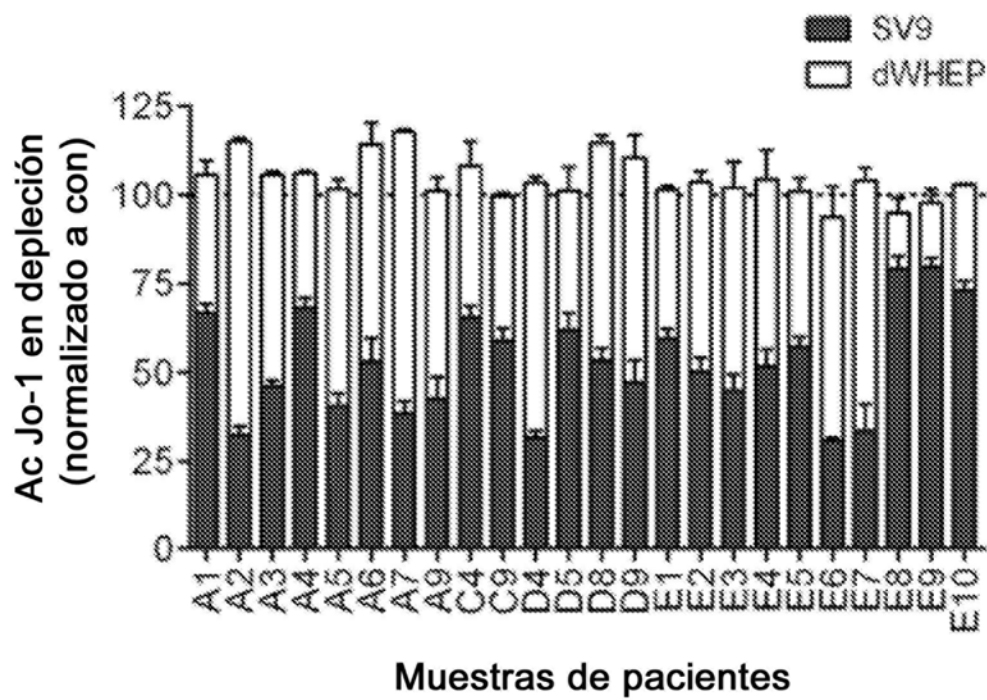
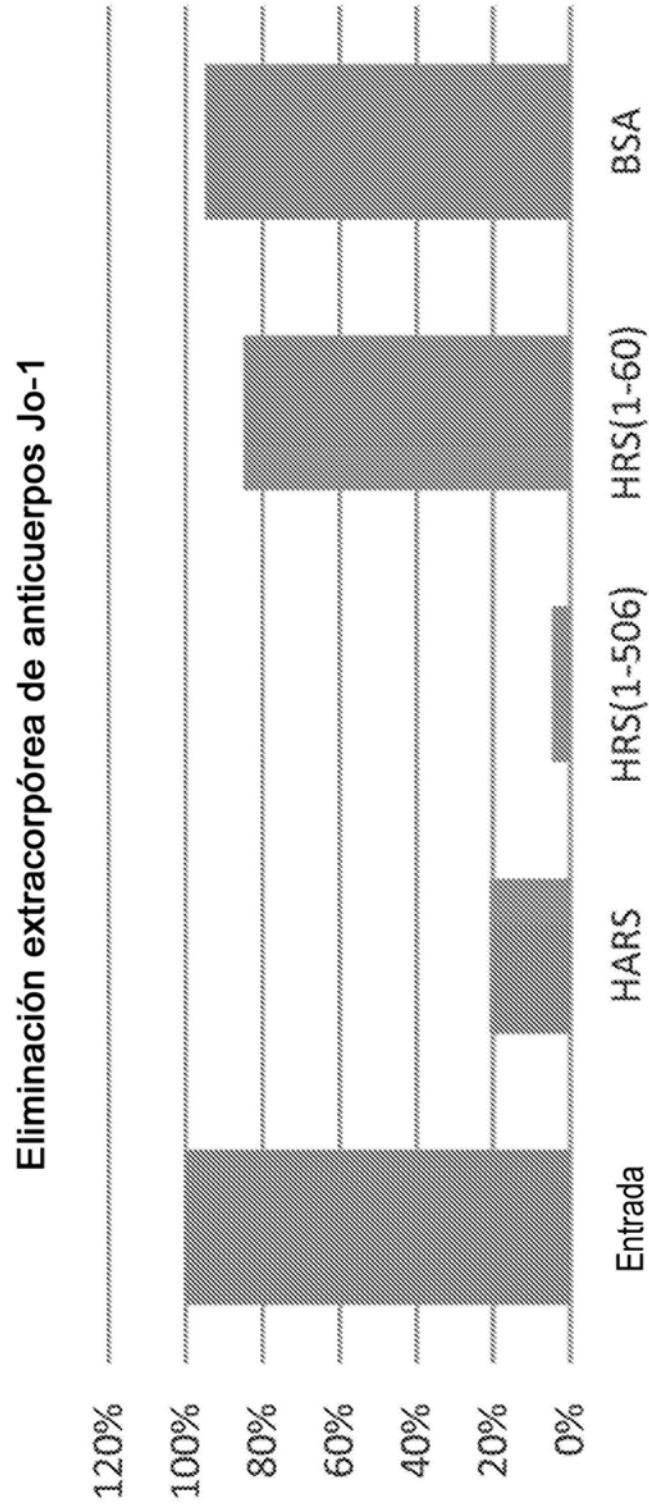


FIG. 8



Flujo a través de columnas inmovilizadas de antígenos

FIG. 9

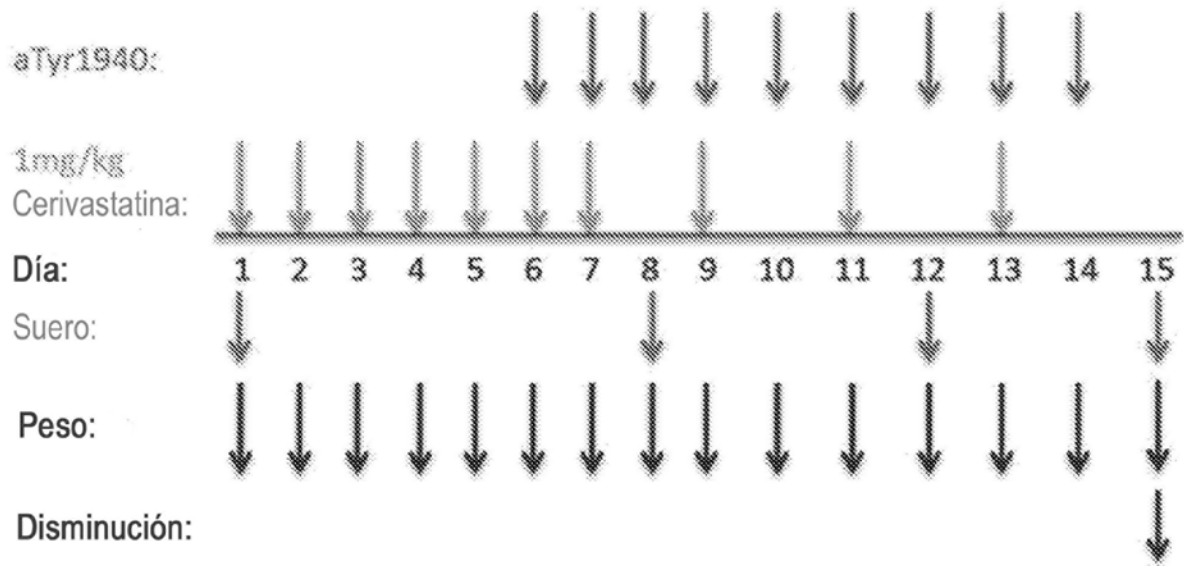


FIG. 10A

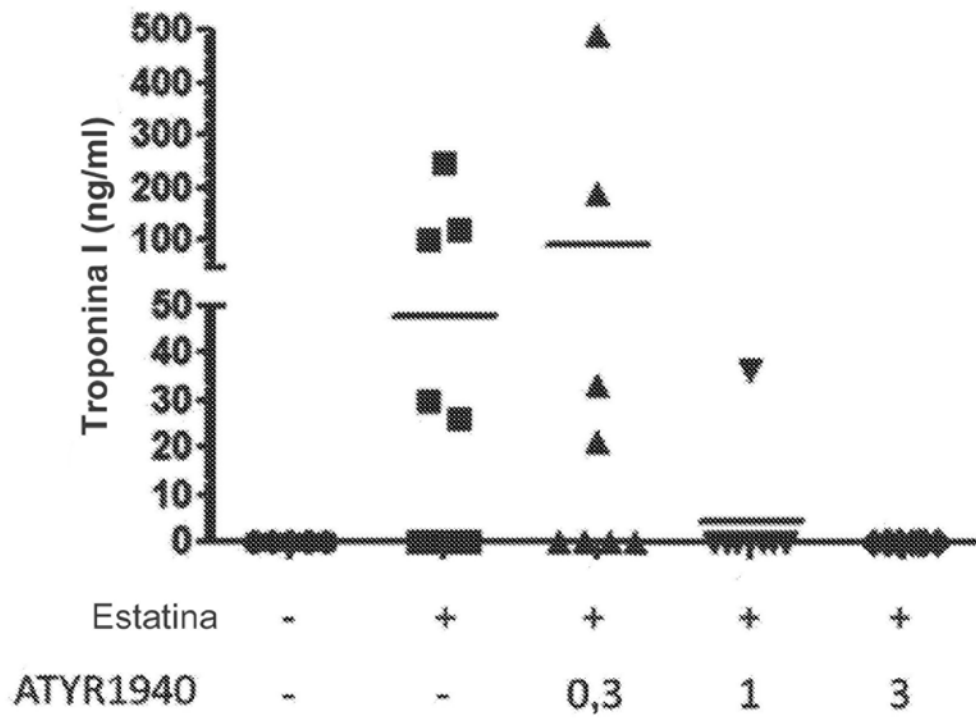


FIG. 10B

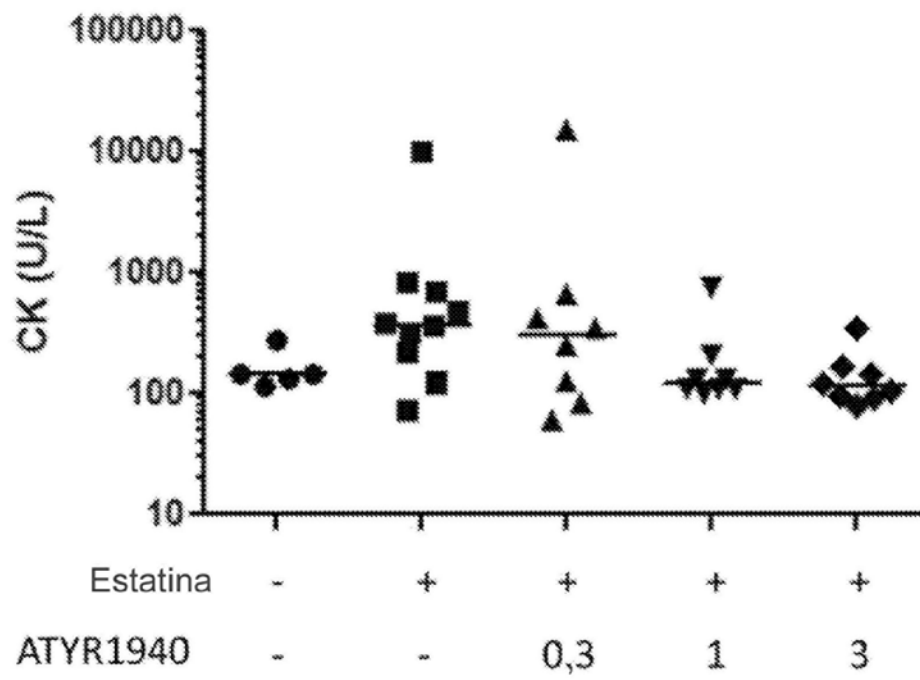


FIG. 11A

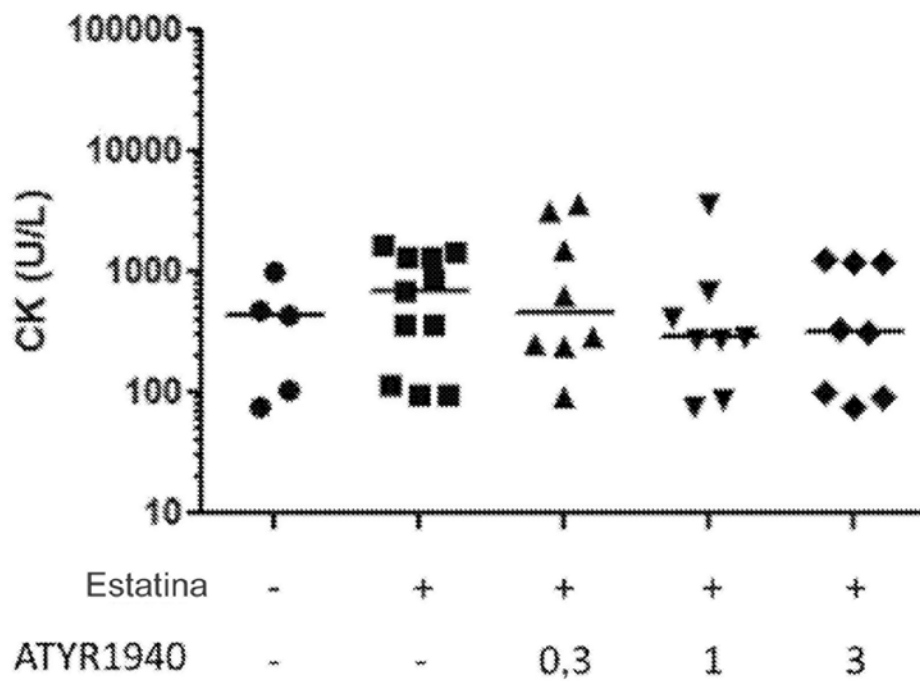


FIG. 11B

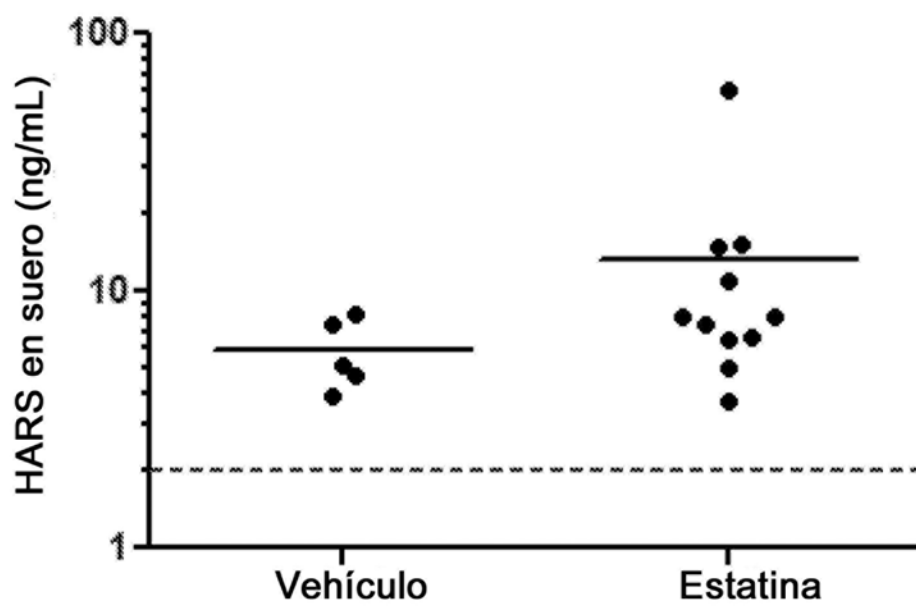


FIG. 12

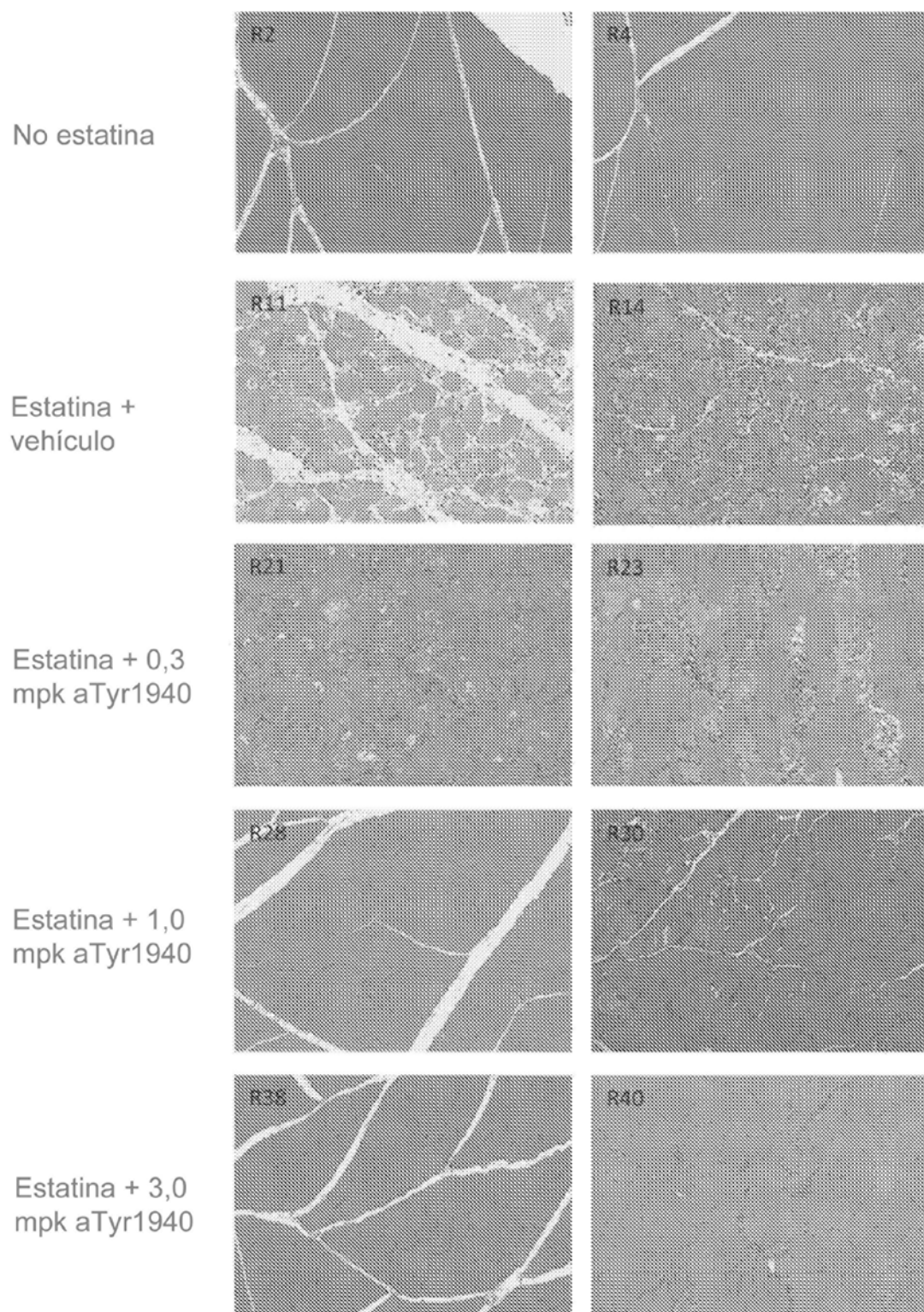


FIG. 13

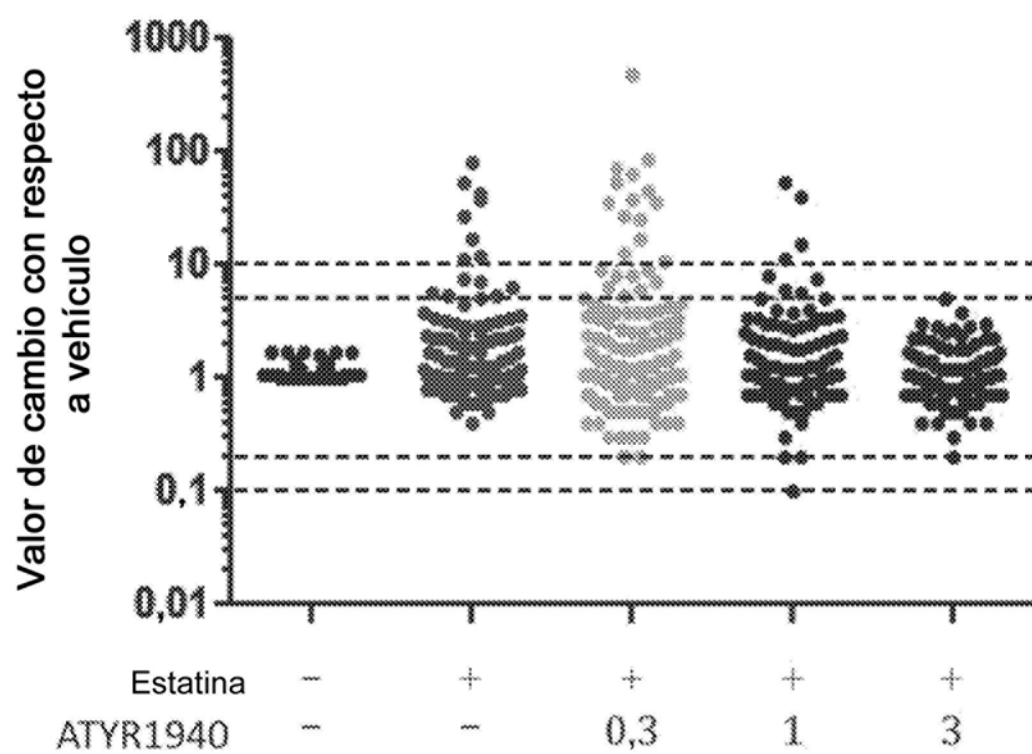


FIG. 14

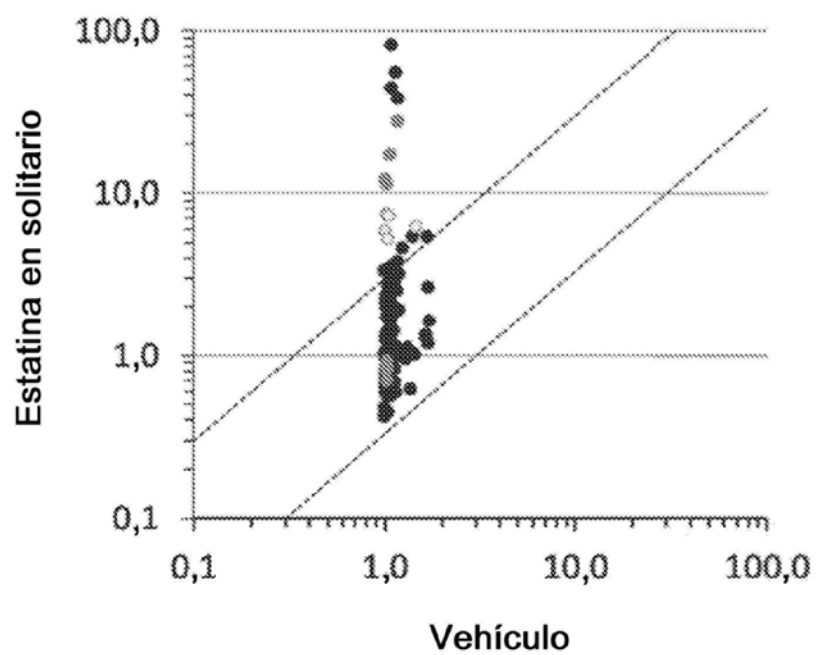


FIG. 15A

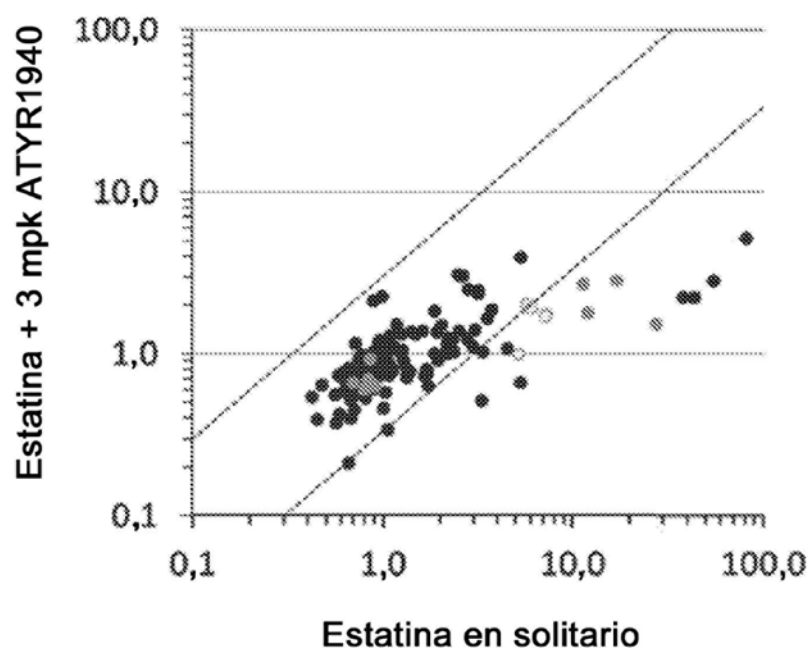


FIG. 15B

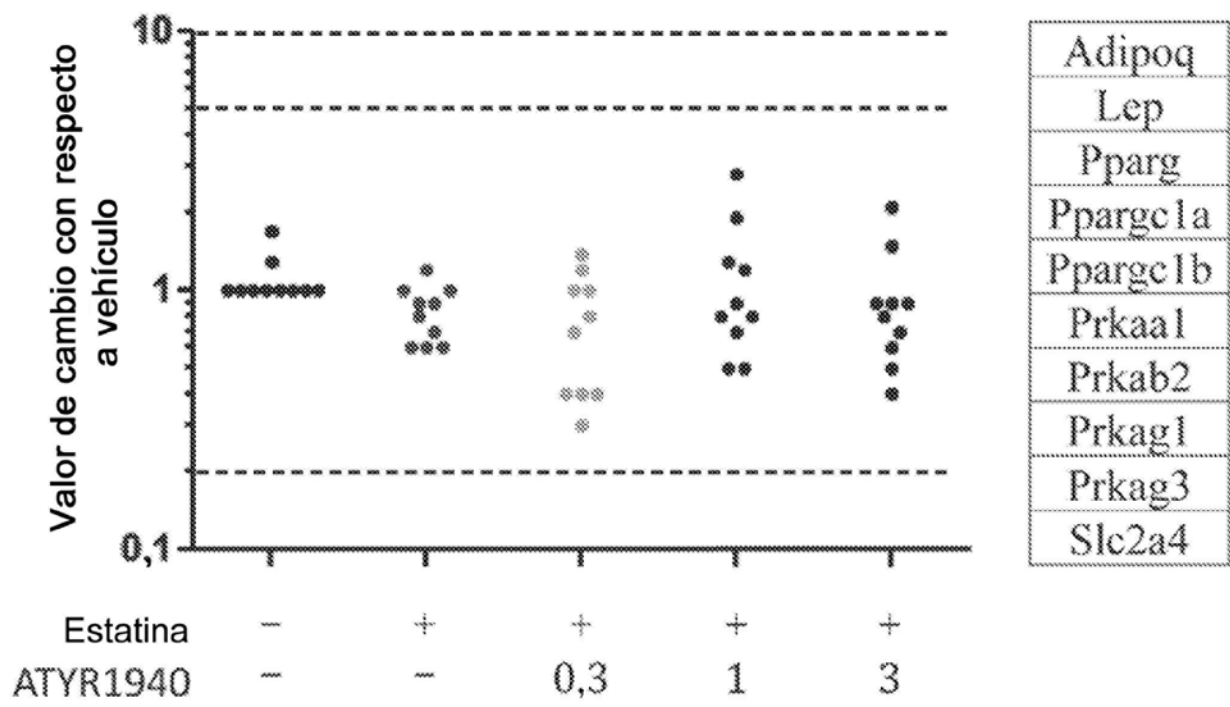


FIG. 16

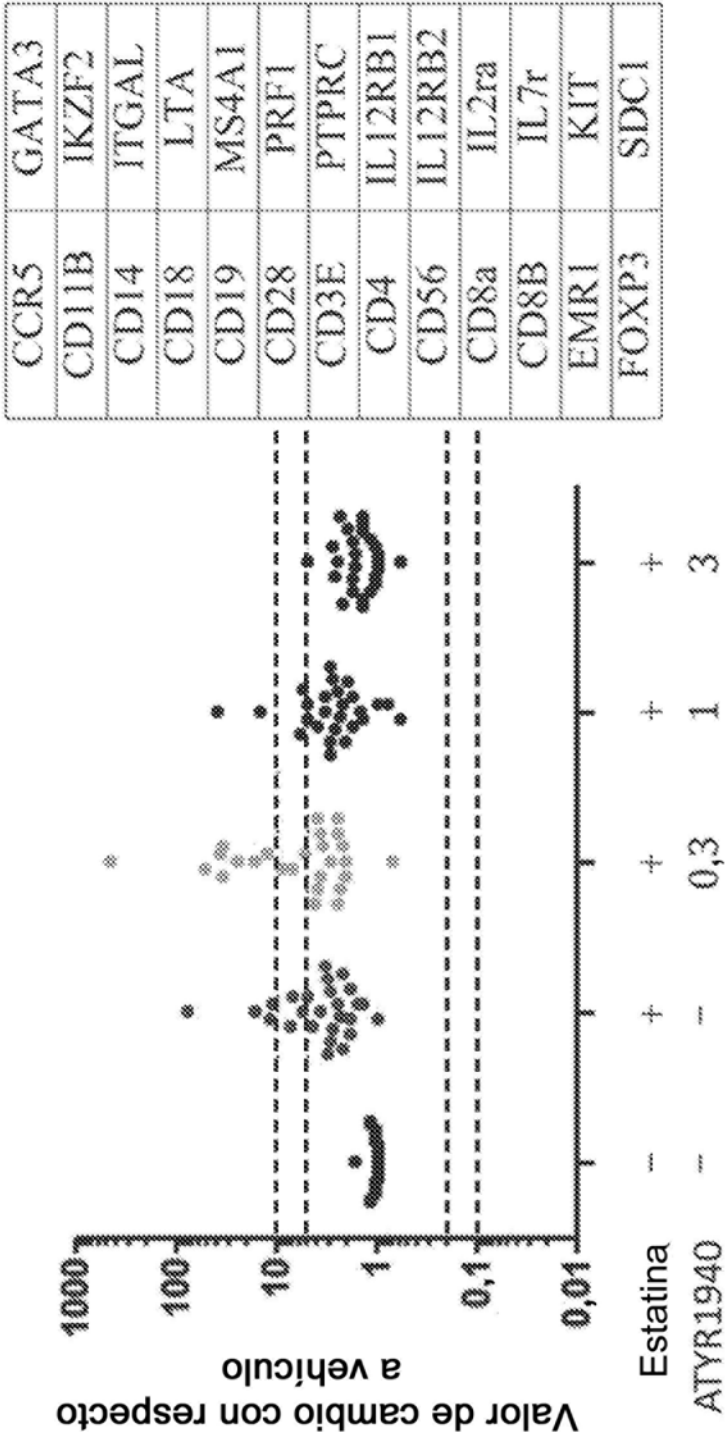


FIG. 17

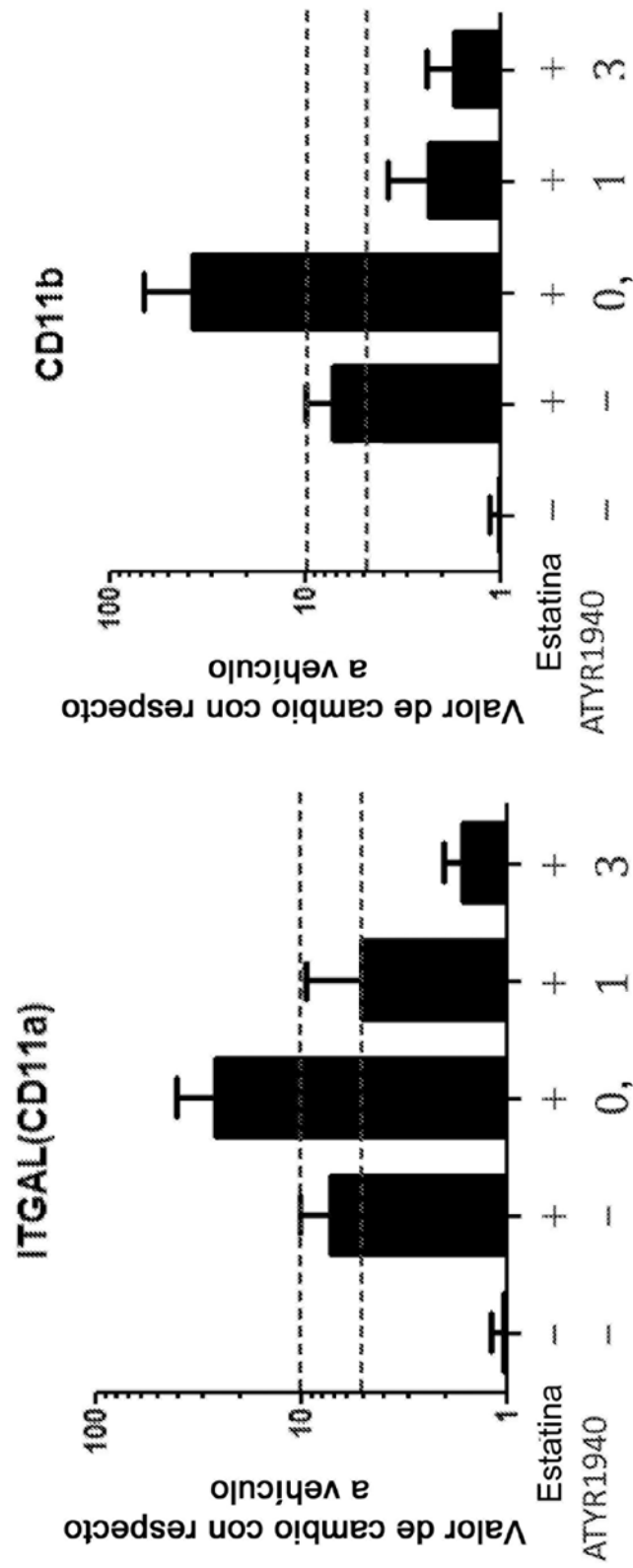


FIG. 18B

FIG. 18A

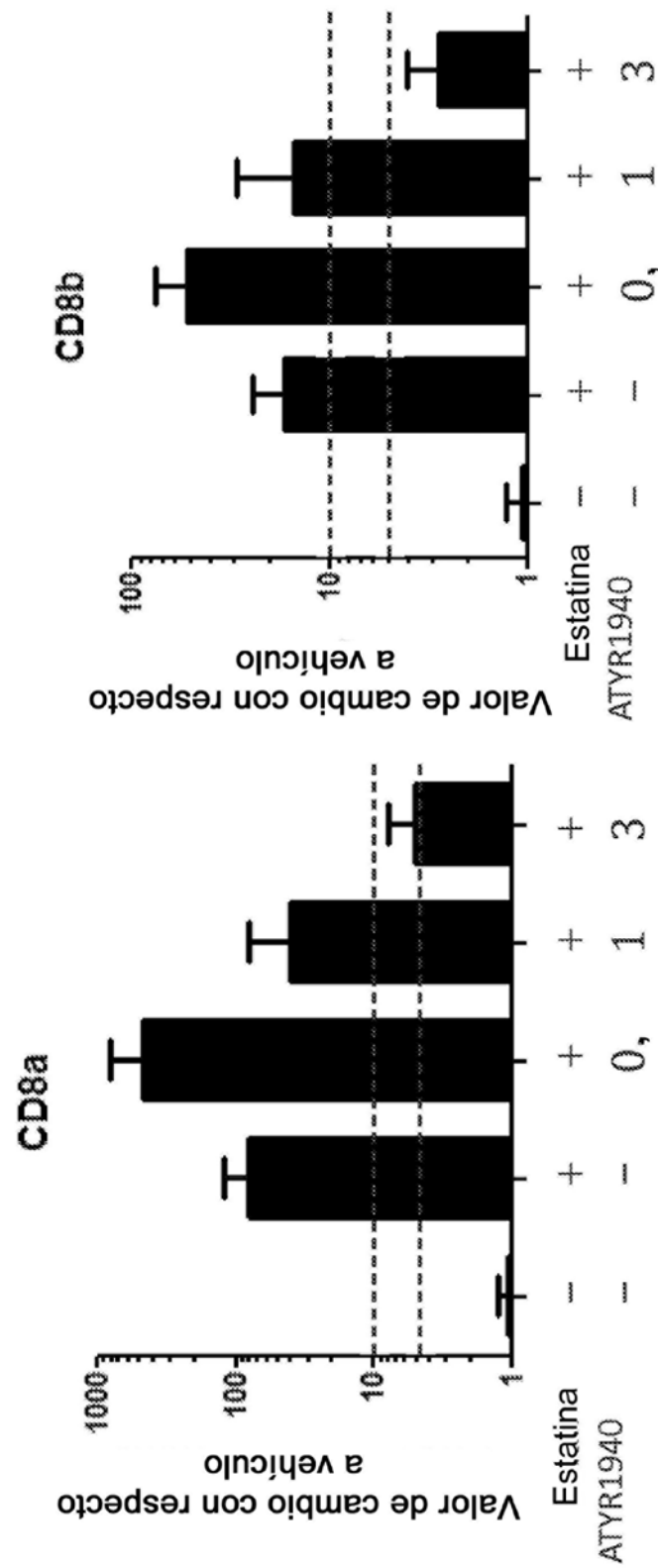


FIG. 18D

FIG. 18C

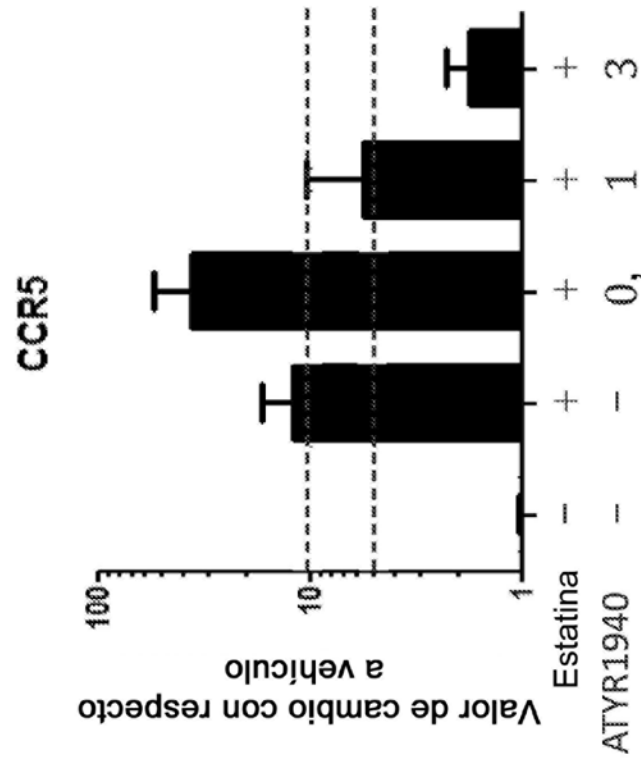


FIG. 19B

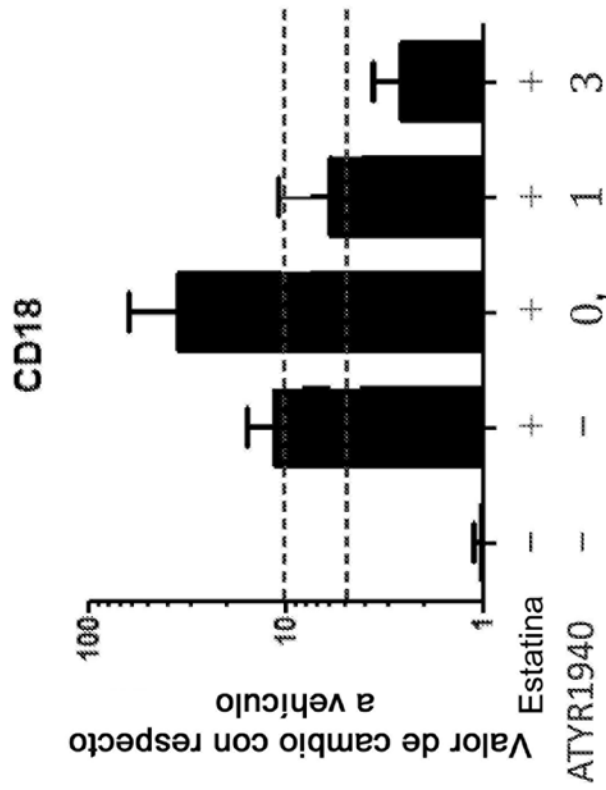
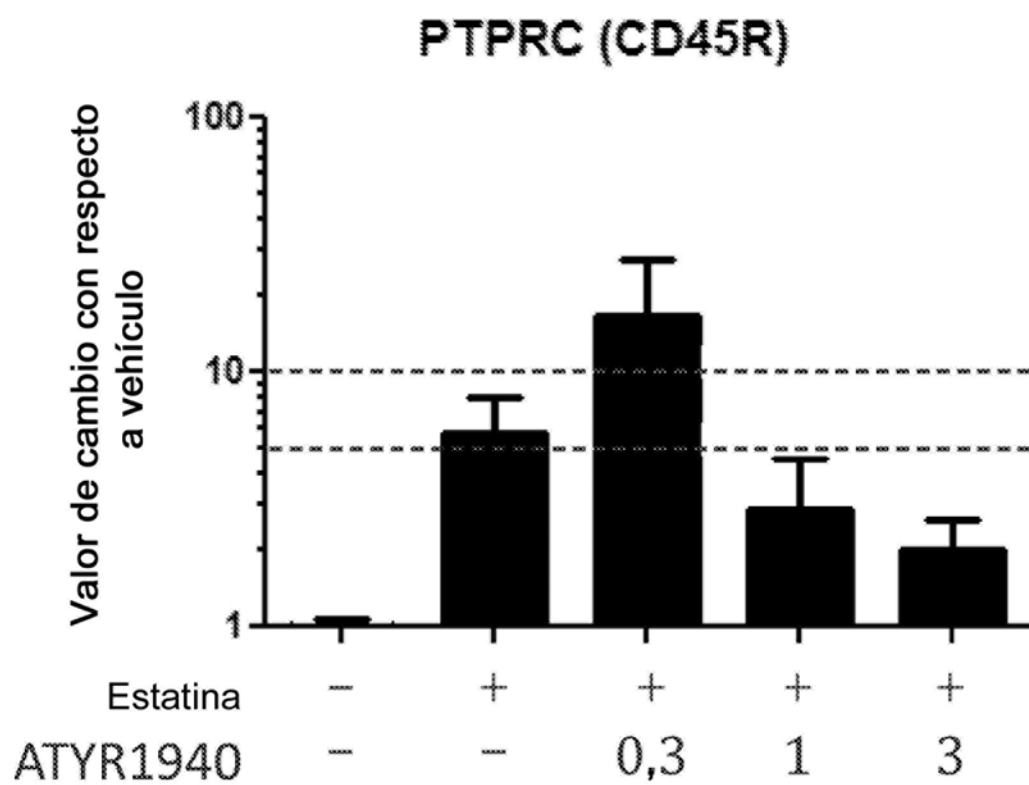


FIG. 19A

*FIG. 19C*

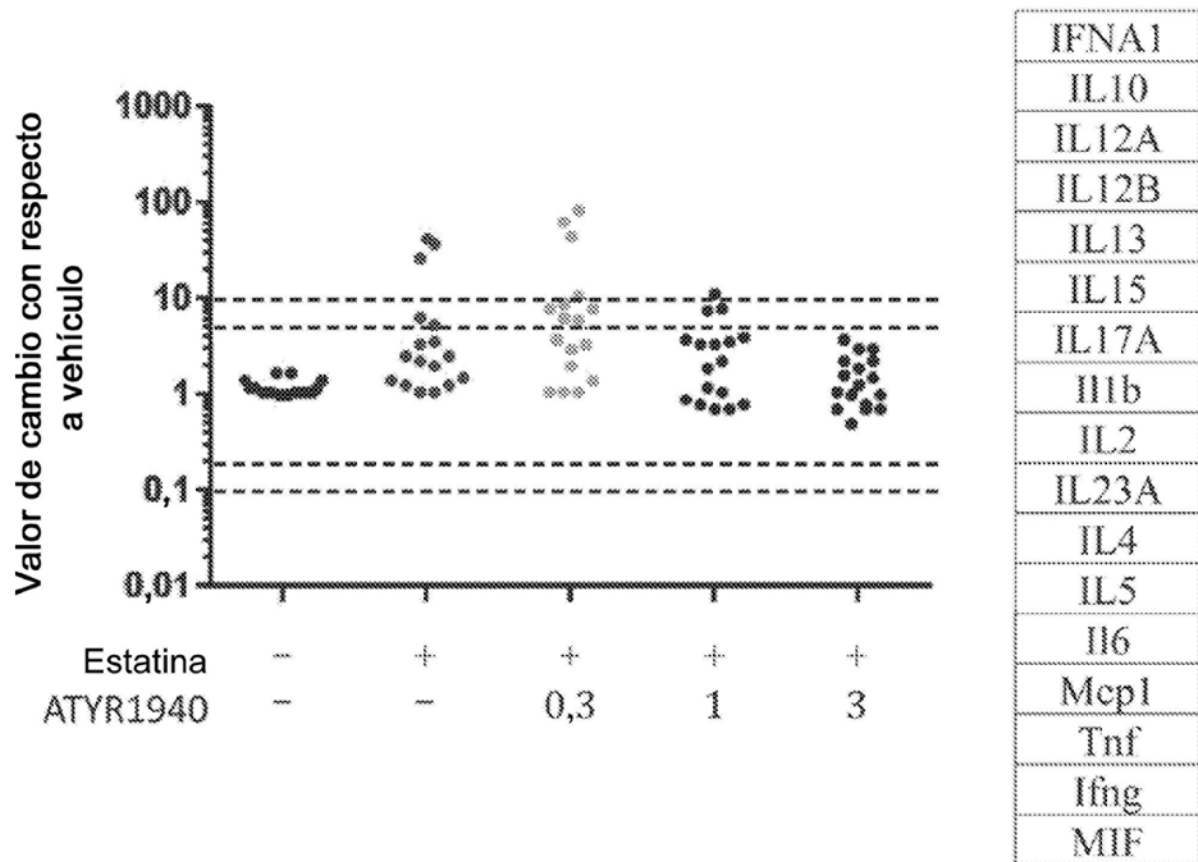


FIG. 20

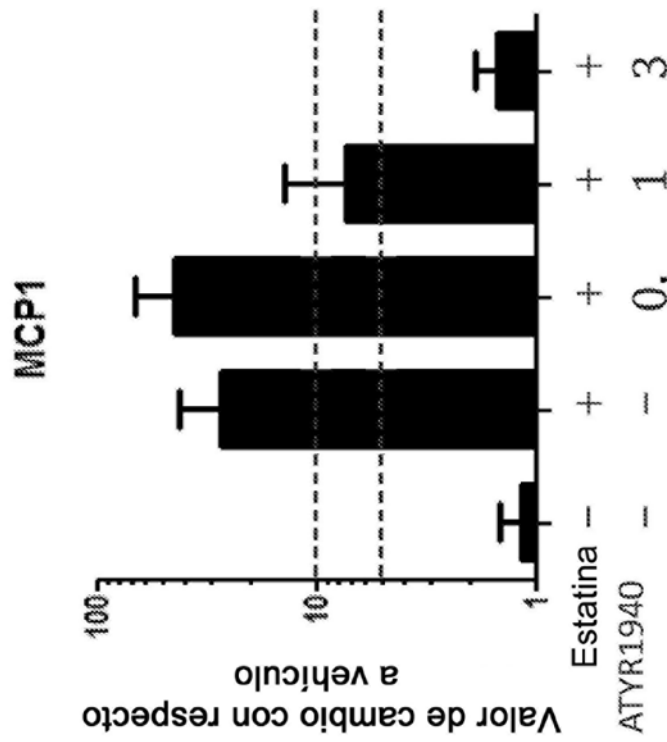


FIG. 21B

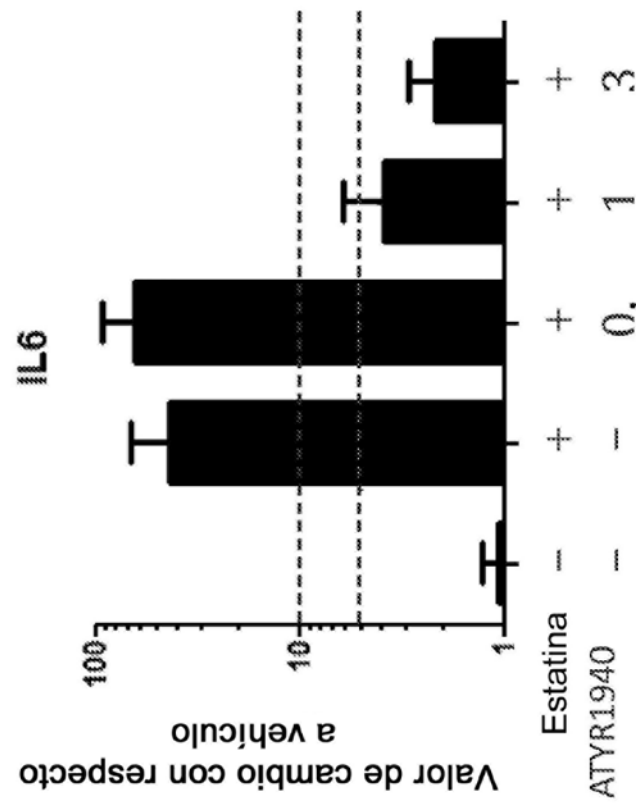


FIG. 21A

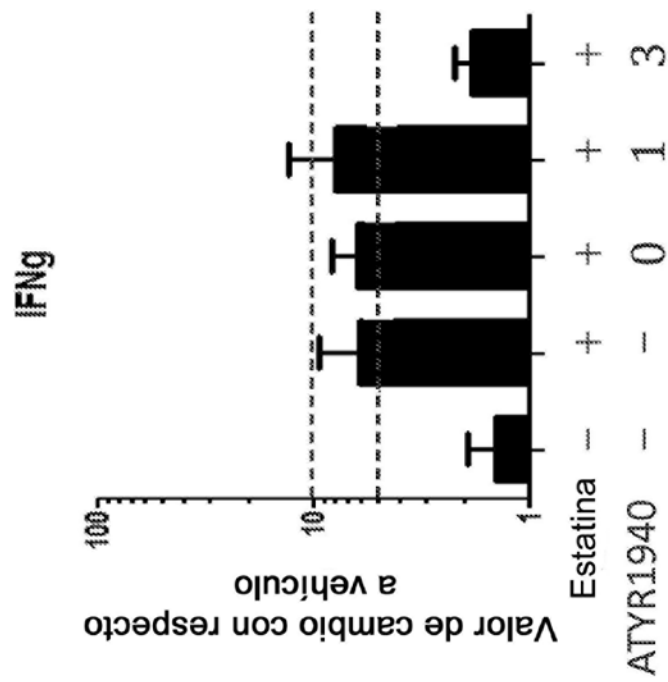


FIG. 21D

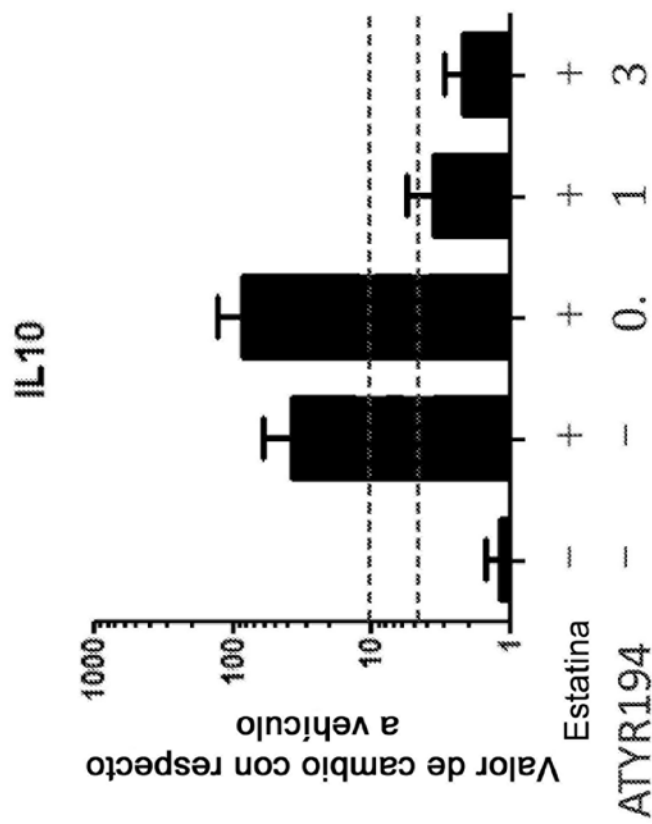


FIG. 21C

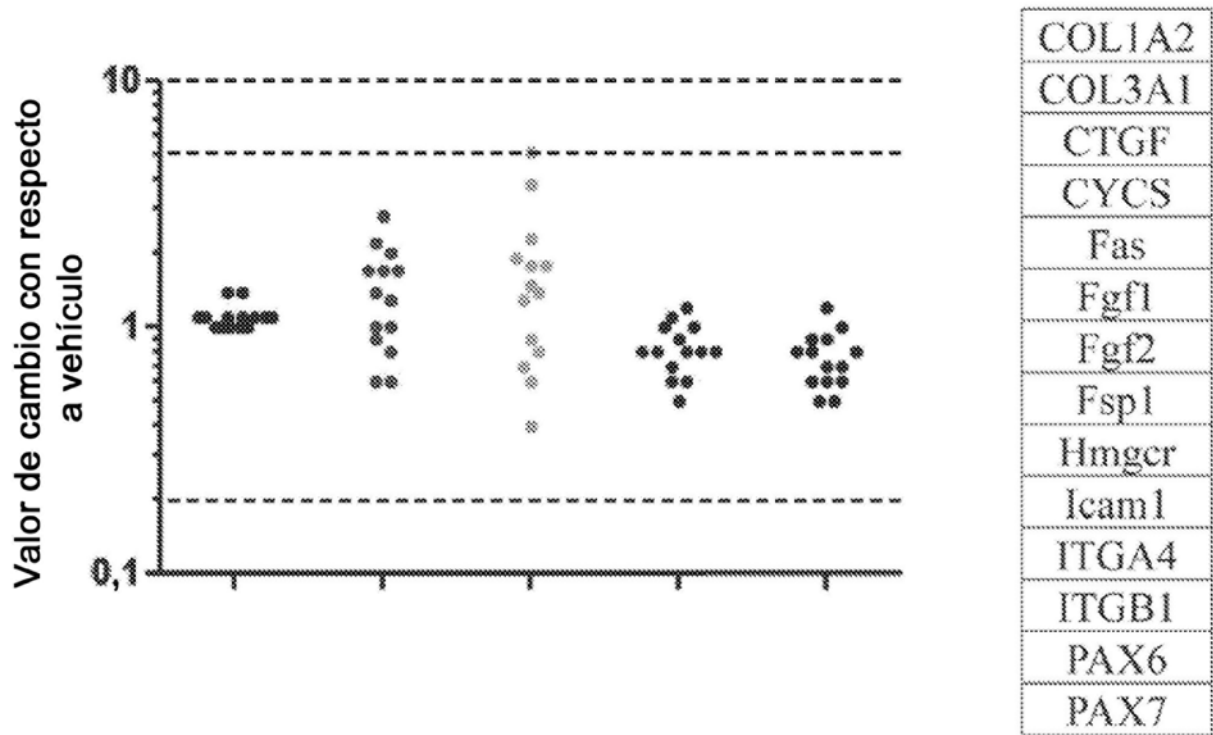


FIG. 22

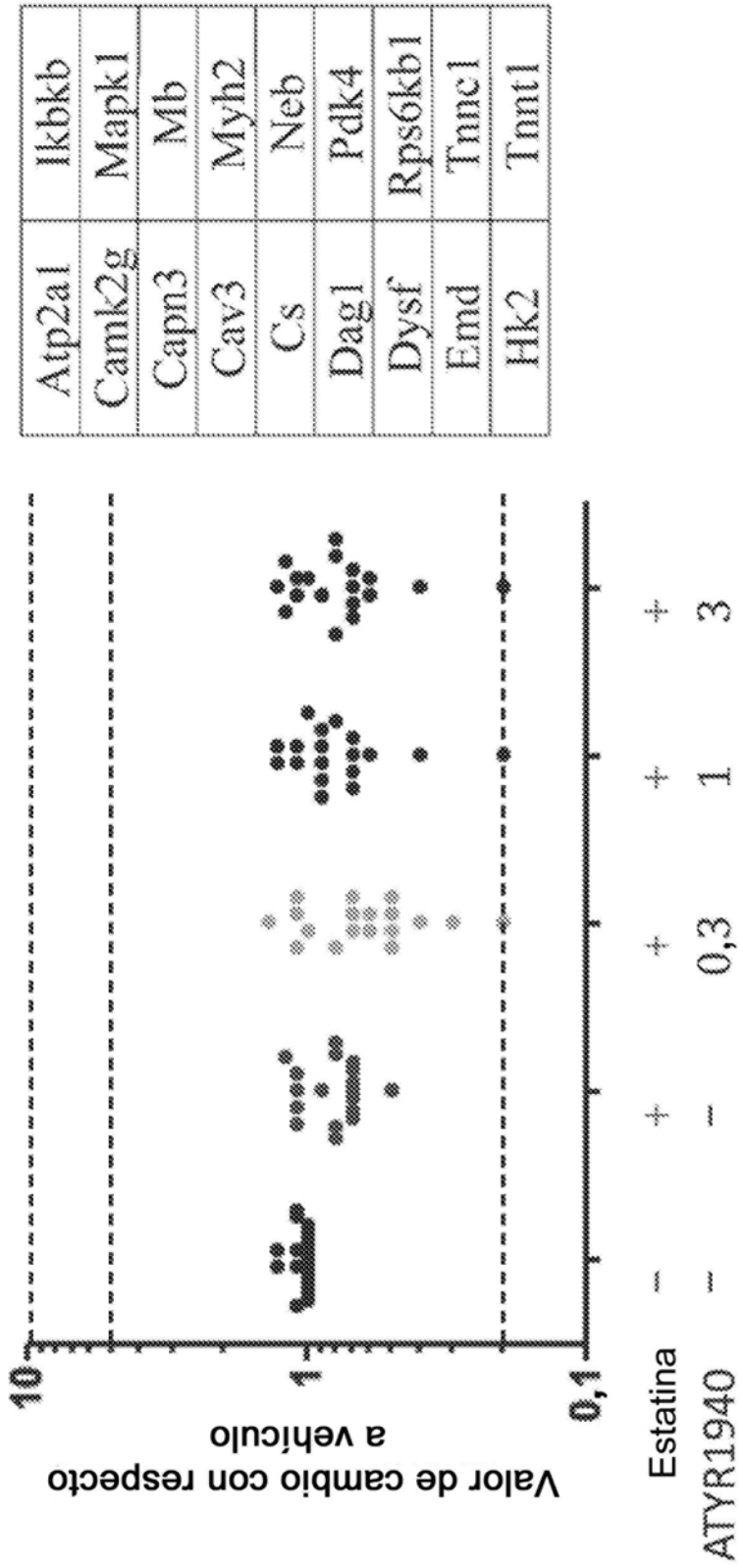


FIG. 23

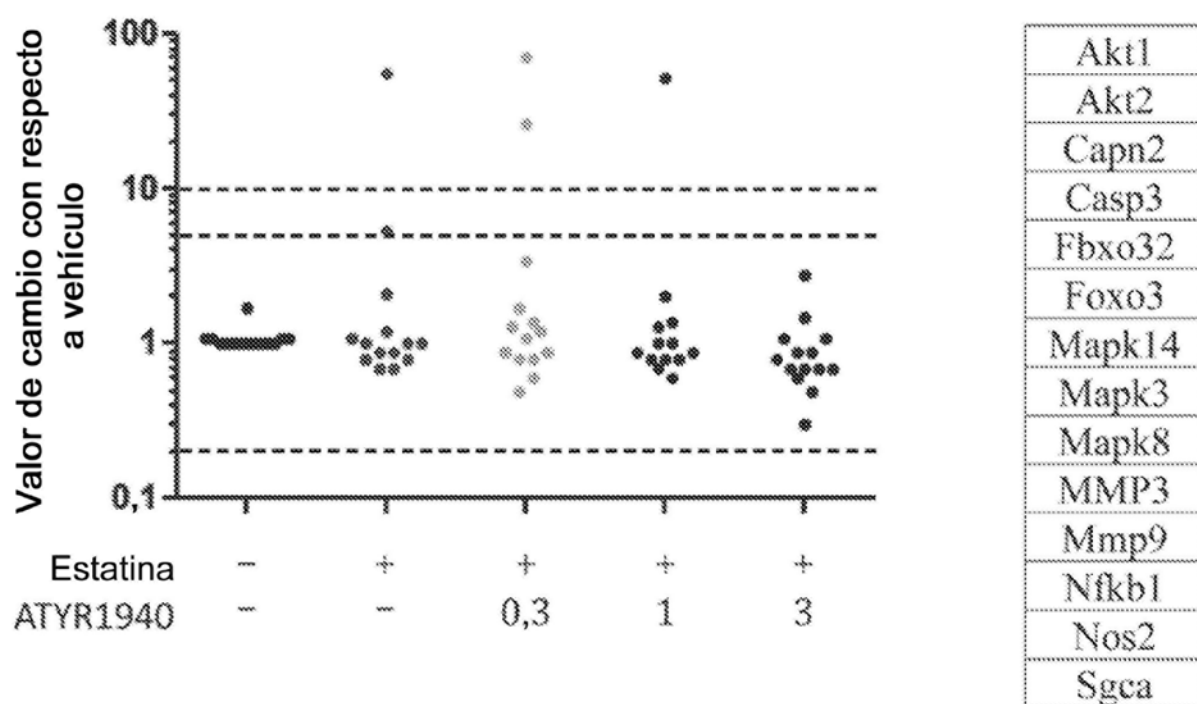


FIG. 24A

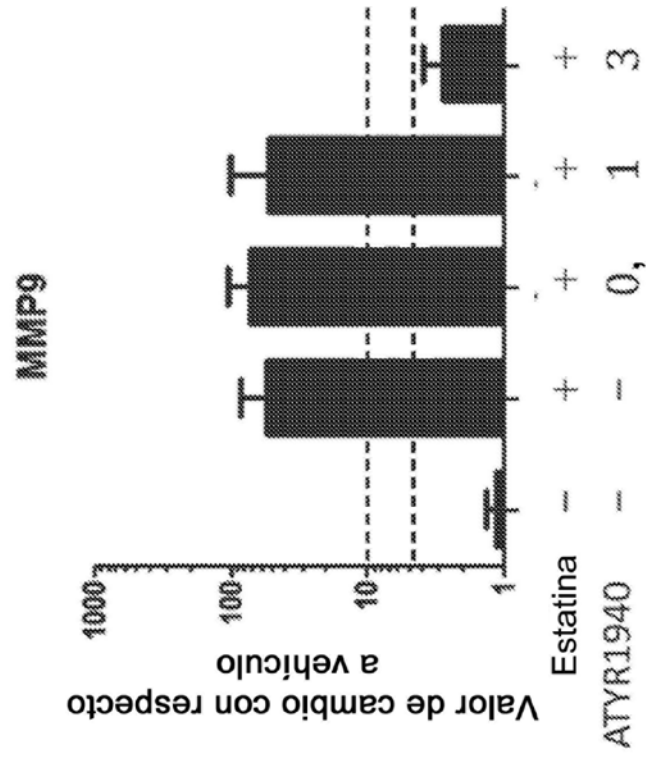


FIG. 24C

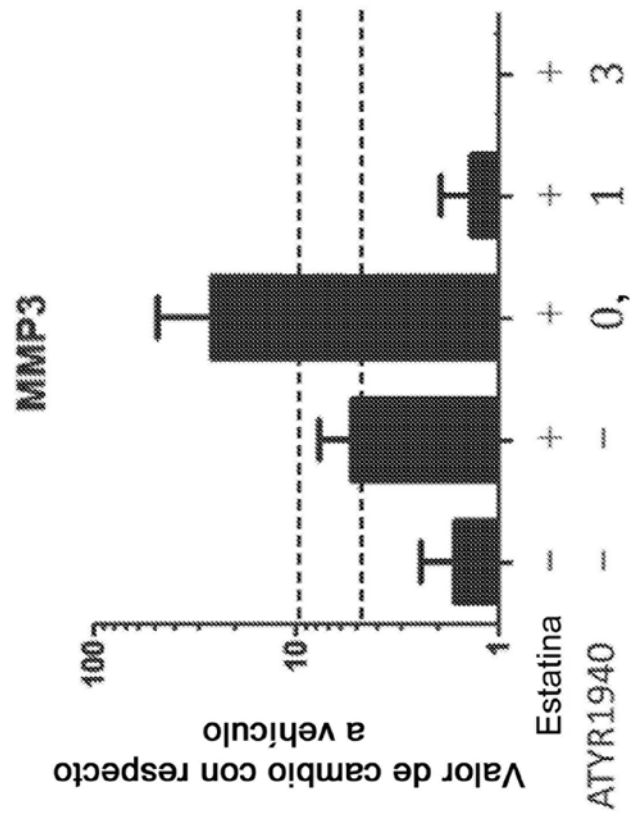


FIG. 24B

Acta1	Mbnl1
Acvr2b	Mef2a
Adrb2	Mef2c
Agm	Mstn
Bcl2	Musk
Bmp4	Myf5
Cast	Myf6
Cav1	Myod1
Cttnb1	Myog
Dmd	Pax3
Hdac5	Ppp3ca
Igf1	Rhoa
Igf2	Tgfb1
Igfbp3	Utrn
Igfbp5	

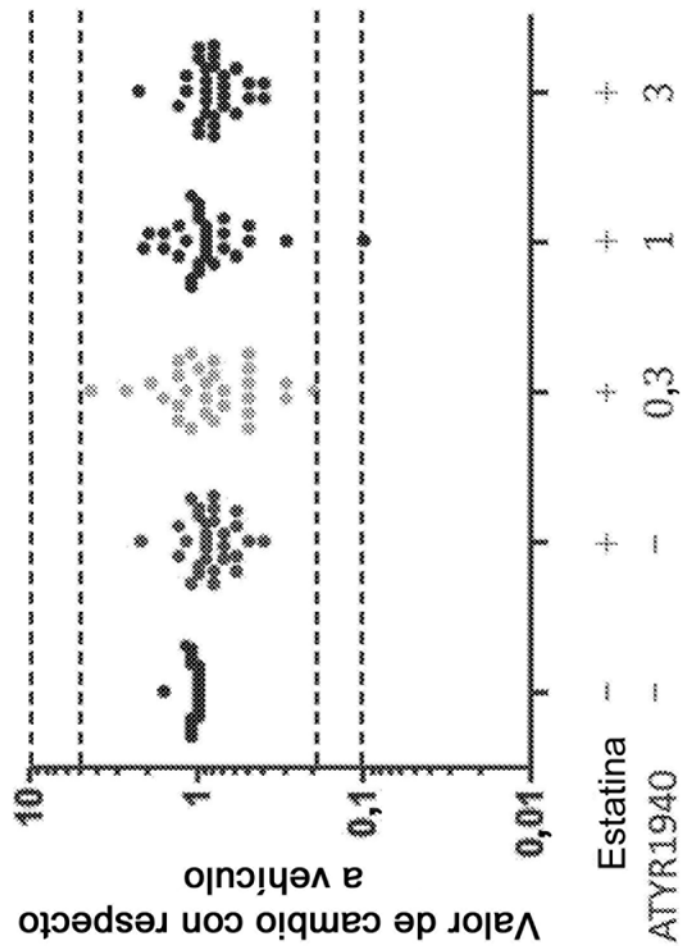


FIG. 25

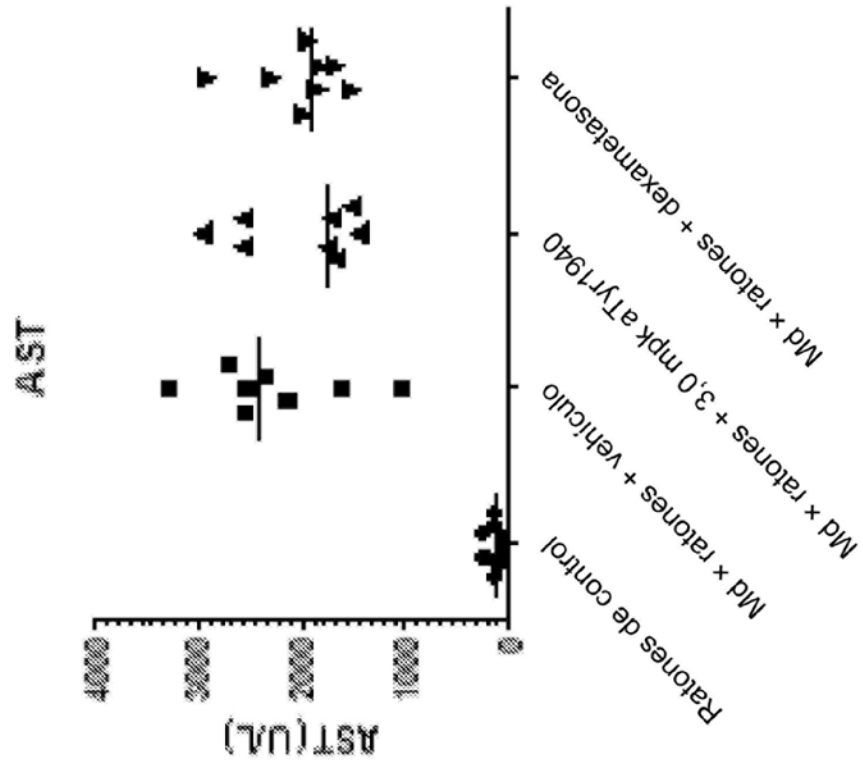


FIG. 26B

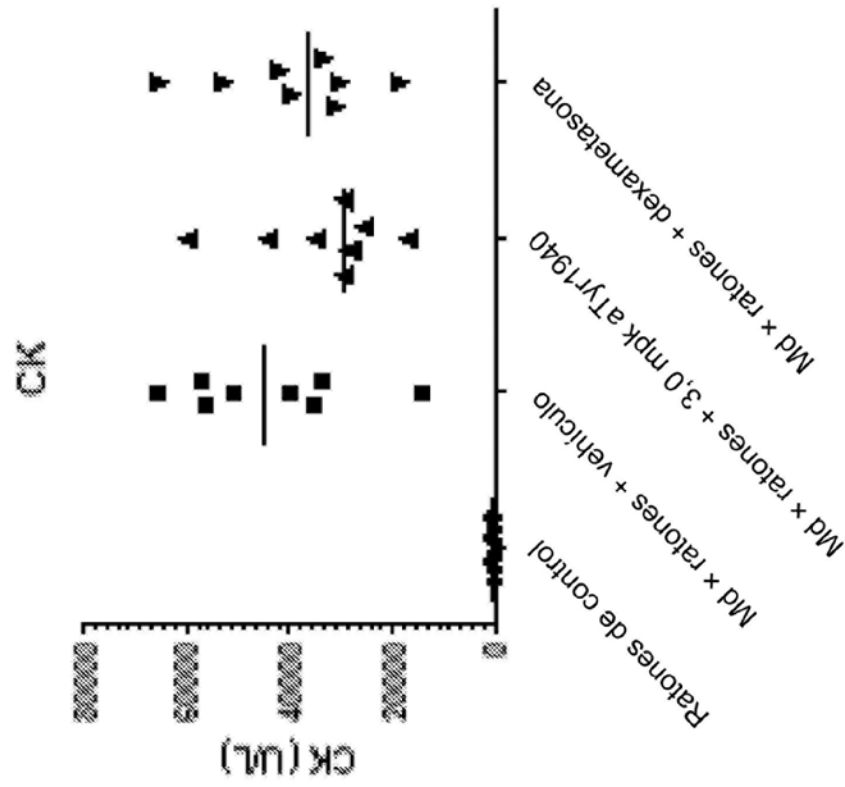


FIG. 26A

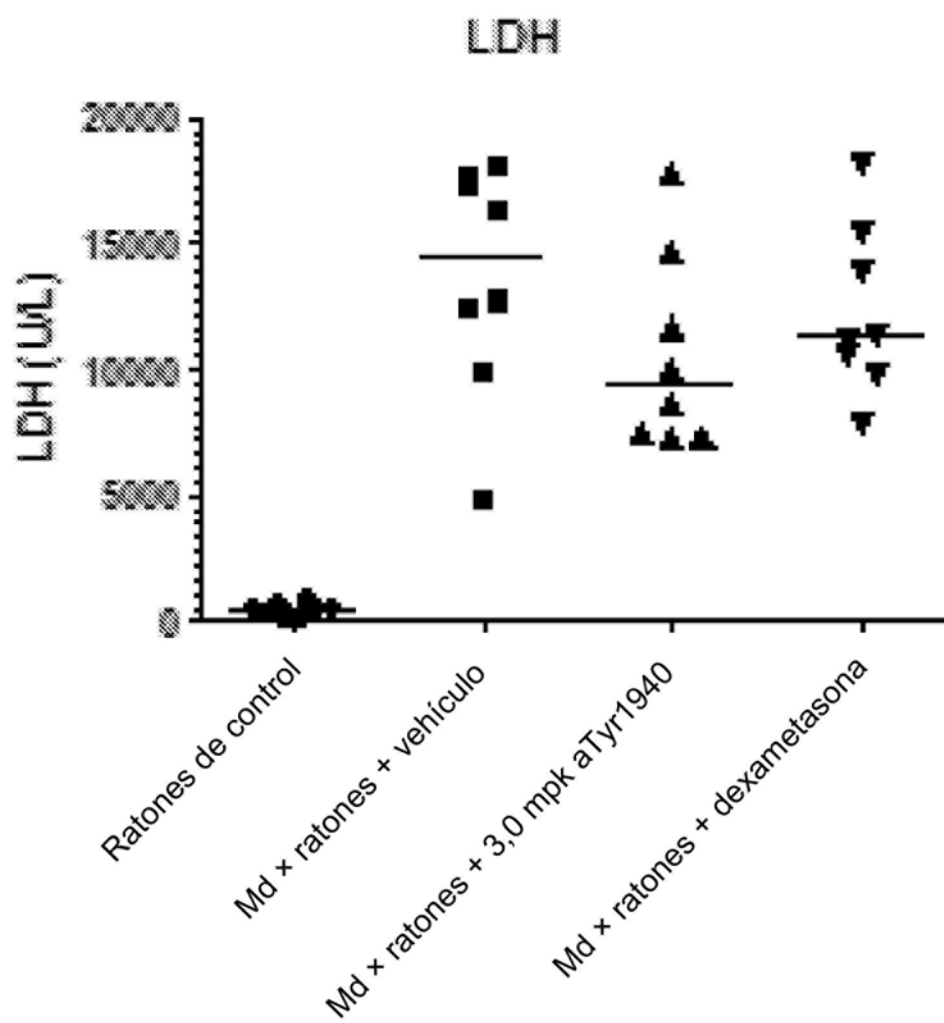


FIG. 26C

aTyr_195B

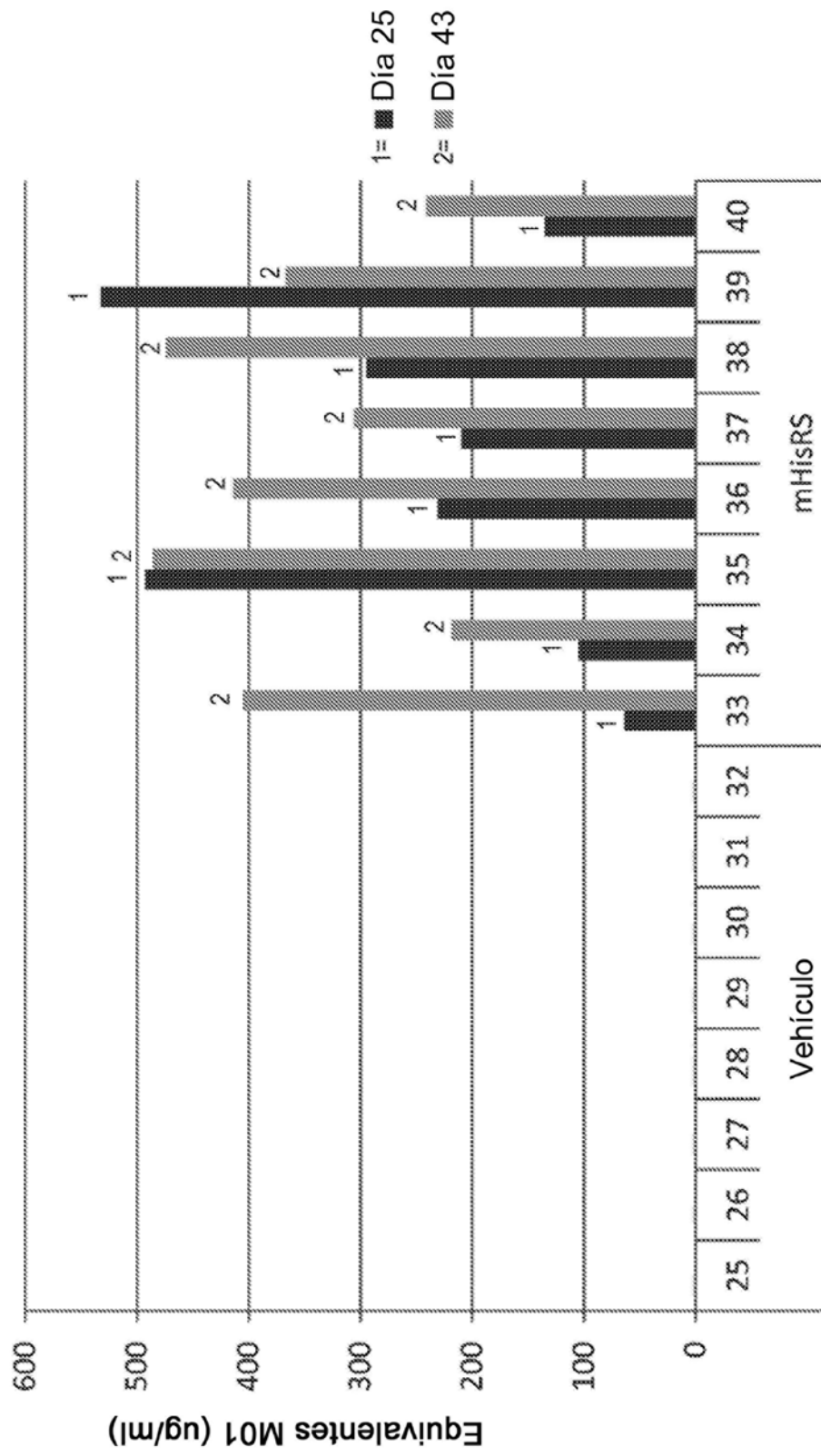


FIG. 27A

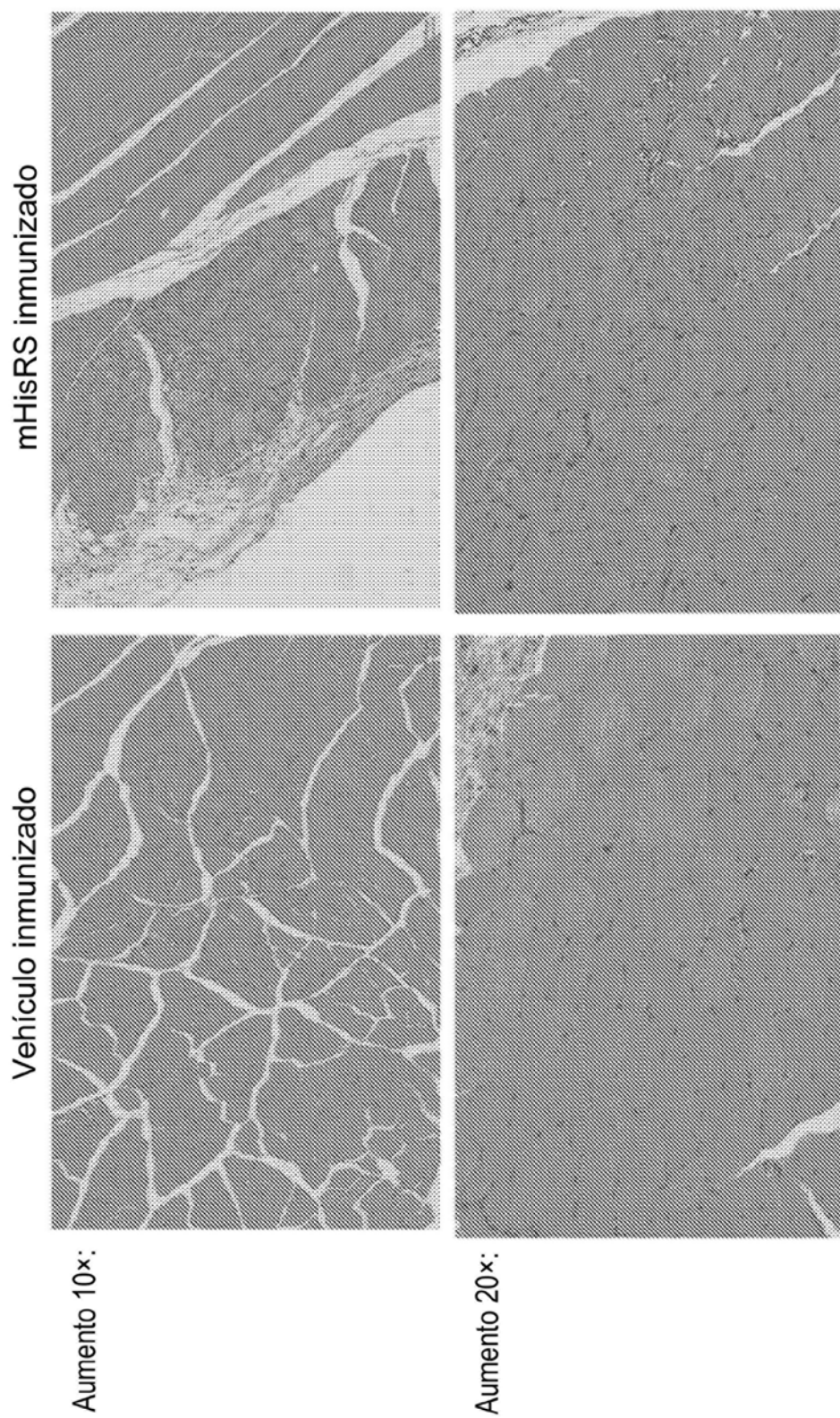


FIG. 27B

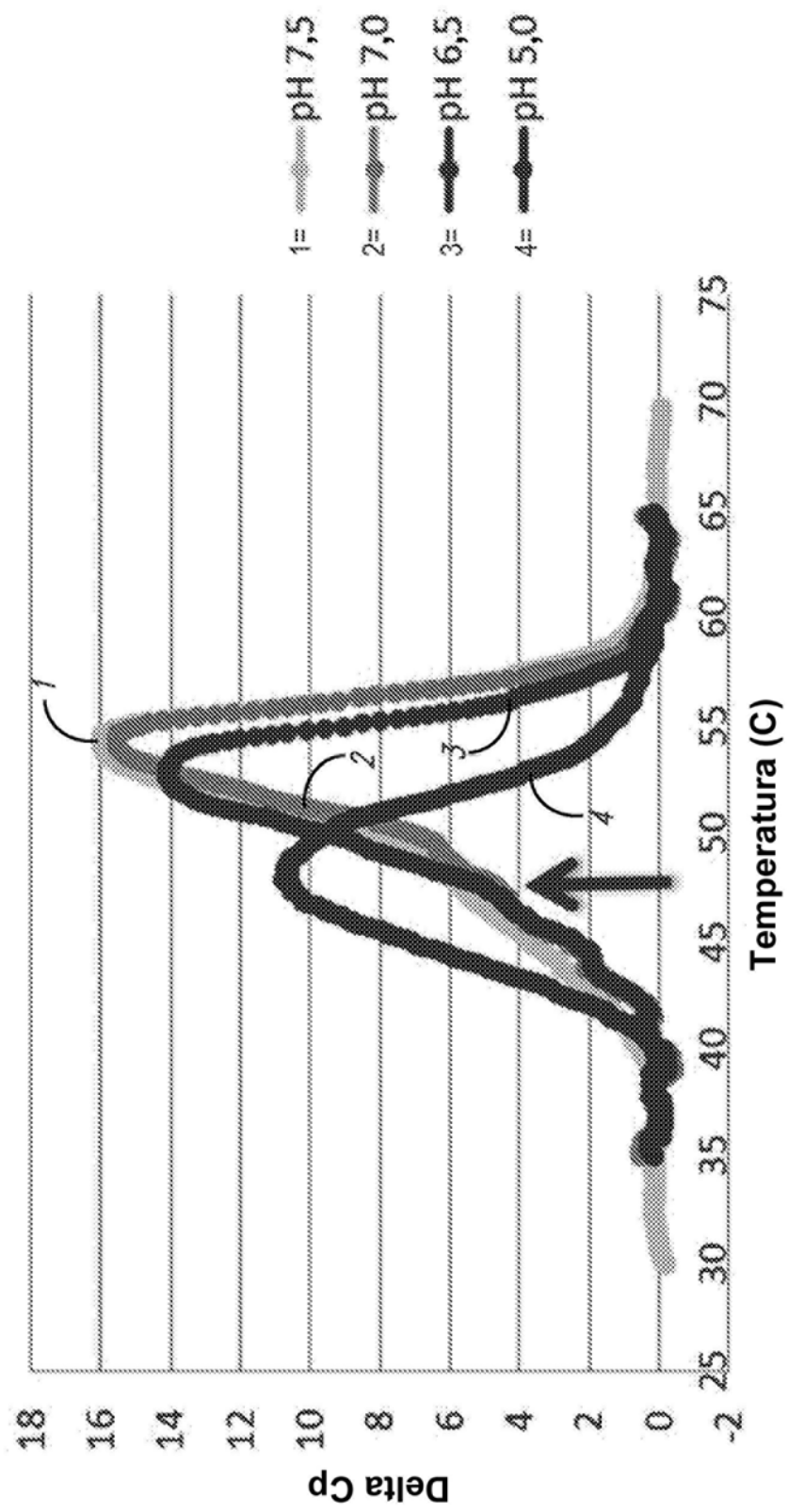


FIG. 28A

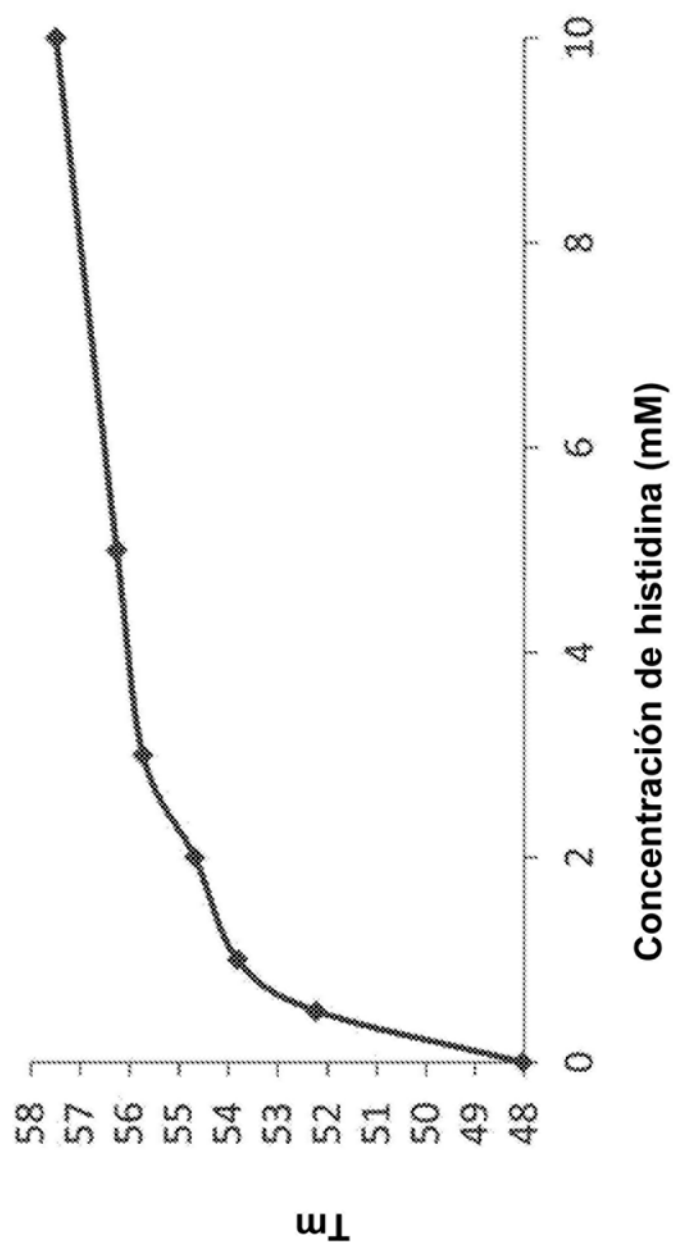


FIG. 28B