



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 301 180**

51 Int. Cl.:
C12N 15/55 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97929686 .0**
86 Fecha de presentación : **09.06.1997**
87 Número de publicación de la solicitud: **0910647**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.1999**

54 Título: **Variantes hiperactivas de DNasa I humana.**

30 Prioridad: **14.06.1996 US 663831**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Lazarus, Robert, A. y**
Pan, Clark, Qun

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 301 180 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

Variantes hiperactivas de DNasa I humana.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los resultados obtenidos de la investigación sobre la desoxirribonucleasa I humana (DNasa I), una fosfodiesterasa que es capaz de hidrolizar ácido polidesoxirribonucleico. Se refiere en general a formas modificadas (variantes) de DNasa I humana que tienen una actividad hidrolítica de ADN incrementada y a su preparación mediante métodos de ADN recombinante, a las composiciones farmacéuticas mediante las cuales se puede aprovechar clínicamente su utilidad, y a los métodos de uso de estas variantes de DNasa I y sus composiciones.

Antecedentes de la invención

15 La DNasa I es una fosfodiesterasa capaz de hidrolizar ácido polidesoxirribonucleico. La DNasa I se ha purificado a partir de diversas especies en diversos grados.

Se ha estudiado bioquímicamente de manera exhaustiva la DNasa I bovina. Véase, p.ej., Moore, en *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed), págs. 281-296, Academic press, Nueva York (1981). Se conoce la secuencia de aminoácidos completa de la DNasa I bovina (Liao, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 248:1489-1495 (1973); Oefner, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 192:605-632 (1986); Lahm, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 221:645-667 (1991)), y se ha clonado y expresado el ADN que codifica la DNasa I bovina (Worrall, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:21889-21895 (1990)). Se ha determinado la estructura de la DNasa I bovina mediante cristalografía de rayos X. Suck, *et al.*, *EMBO J.* 3:2423-2430 (1984); Suck, *et al.*, *Nature* 321:620-625 (1986); Oefner, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 192:605-632 (1986); Weston, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:1237-1256 (1992).

25 Se ha aislado y secuenciado el ADN que codifica la DNasa I humana, y ese ADN se ha expresado en células hospedadoras recombinantes, lo que ha permitido la producción de DNasa I humana en cantidades comercialmente útiles. Shak, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87:9188-9192 (1990).

30 La DNasa I tiene varias utilidades conocidas, y se ha usado para fines terapéuticos. Su uso terapéutico principal ha sido reducir la viscoelasticidad de las secreciones pulmonares (mucosidad) en enfermedades tales como neumonía y fibrosis quística (FQ), por lo que ayuda en la desobstrucción de las vías respiratorias. Véase, p.ej., Lourenco, *et al.*, *Arch. Intern. Med.* 142:2299-2308 (1982); Shak, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87:9188-9192 (1990); Hubbard, *et al.*, *New Engl. J. Med.* 326:812-815 (1992); Fuchs, *et al.*, *New Engl. J. Med.* 331:637-642 (1994); Bryson, *et al.*, *Drugs* 48:894-906 (1994). La mucosidad también contribuye a la morbilidad de la bronquitis crónica, bronquitis asmática, bronquiectasia, enfisema, sinusitis aguda y crónica, e incluso del resfriado común.

40 Las secreciones pulmonares de las personas que tienen tales enfermedades son materiales complejos, que incluyen glicoproteínas mucosas, mucopolisacáridos, proteasas, actina y ADN. Algunos de los materiales de las secreciones pulmonares son liberados por los leucocitos (neutrófilos) que infiltran el tejido pulmonar en respuesta a la presencia de microbios (p.ej., cepas de bacterias *Pseudomonas*, *Pneumococcus* o *Staphylococcus*) u otros agentes irritantes (p.ej., humo de tabaco, polen). Durante el transcurso de la reacción con tales microbios o agentes irritantes, los leucocitos pueden degenerar y liberar su contenido, lo que contribuye a la viscoelasticidad de las secreciones pulmonares.

45 La capacidad de la DNasa I para reducir la viscoelasticidad de las secreciones pulmonares se ha atribuido a la degradación enzimática de la gran cantidad de ADN liberada por los neutrófilos. Shak, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87:9188-9192 (1990); Aitken, *et al.*, *J. Am. Med. Assoc.* 267:1947-1951 (1992).

50 Suck, *et al.*, *J. Mol. Recognit.*, 7(2): 65-70 (junio de 1994) describe la estructura del complejo ADN-DNasa I e identifica varios residuos de la enzima que están implicados en la formación del complejo.

Se describen variantes de DNasa I que tienen actividad enzimática incrementada, p.ej., en el documento WO 90 07572 A (publicado el 12 de julio de 1990) y en el documento WO 96 26279 A (publicado el 29 de agosto de 1996).

55 **Resumen de la invención**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar variantes de DNasa I humana que tienen una actividad hidrolítica de ADN mayor que la DNasa I humana nativa.

60 Otro objetivo de la invención es proporcionar ácidos nucleicos que codifican tales variantes hiperactivas de la DNasa I humana, vectores recombinantes que comprenden tales ácidos nucleicos, células hospedadoras recombinantes transformadas con esos ácidos nucleicos o vectores, y procesos para producir las variantes de DNasa I humana por medio de la técnica de ADN recombinante. La invención incluye el uso de tales ácidos nucleicos y vectores para la terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

65 Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden las variantes hiperactivas de la DNasa I humana, opcionalmente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

ES 2 301 180 T3

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan variantes de DNasa I humana que tienen una identidad de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de la DNasa I humana nativa mostrada en la Figura 1, que comprenden además una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Q9R, E13K, T14K, T14R, H44K, H44R, N74K, N74R, S75K, T205K y T205R; en las que dicha variante tiene una actividad hidrolítica de ADN mayor que la DNasa I humana nativa.

En una realización preferida de la presente invención, la variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95%, más preferiblemente una identidad de al menos el 98%, con la secuencia de aminoácidos de la DNasa I humana nativa mostrada en la Figura 1.

En otra realización de la presente invención, la variante comprende al menos una de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: E13R:N74K, Q9R:E13R:N74K, E13R:N74K:T205K, Q9R:E13R:N74K:T205K.

En aún otra realización de la presente invención, la variante tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de ID SEC N°:2, ID SEC N°:3, ID SEC N°:5, ID SEC N°:6, ID SEC N°:7, ID SEC N°:8, ID SEC N°:9, ID SEC N°:10, ID SEC N°:11, ID SEC N°:12, ID SEC N°:13, ID SEC N°:14, ID SEC N°:15, ID SEC N°:16 e ID SEC N°:17.

La presente invención se dirige además a los ácidos nucleicos aislados que codifican dichas variantes de DNasa I humana.

Además, la presente invención se dirige al uso de dichas variantes de DNasa I humana en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno pulmonar. Esto incluye el uso para reducir la viscoelasticidad o la consistencia viscosa del material que contiene ADN en un paciente, y para reducir o prevenir la formación de complejos inmunitarios que contienen ADN en un paciente. La invención se dirige en particular al tratamiento de enfermedades tales como fibrosis quística, bronquitis crónica, neumonía, bronquiectasia, enfisema, asma o lupus eritematoso sistémico.

Además, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende una variante de DNasa I humana como se definió anteriormente, y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se basa en parte en la investigación de los inventores para estudiar la actividad enzimática de la DNasa I humana. Esta investigación implicó el diseño y la síntesis de diversas variantes de DNasa I humana, y el ensayo de estas variantes para determinar su capacidad de hidrolizar el ADN *in vitro*. Los inventores han identificado por primera vez una clase de variantes de DNasa I humana, denominadas variantes hiperactivas, que tienen una actividad hidrolítica de ADN incrementada y que son menos susceptibles a la inhibición por cloruro sódico, en comparación con la DNasa I humana nativa.

Debido a su actividad hidrolítica de ADN incrementada, las variantes hiperactivas también tienen una actividad mucolítica incrementada y son más eficaces que la DNasa I humana nativa en la degradación (digestión) del ADN en general. Debido a que son menos susceptibles a la inhibición por cloruro sódico, las variantes hiperactivas son más eficaces que la DNasa I humana nativa en condiciones salinas fisiológicas, tal como ocurre en las secreciones pulmonares y en otras secreciones biológicas. Por lo tanto, las variantes hiperactivas de la DNasa I humana son especialmente útiles para tratar pacientes que tienen secreciones pulmonares que comprenden cantidades relativamente grandes de ADN.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la DNasa I humana madura (ID SEC N°: 1). Los números indican la posición secuencial de los residuos de aminoácido en la secuencia.

Las Figuras 2-4 muestran los datos para las siguientes variantes:

Q9R (ID SEC N°: 2), E13K (ID SEC N°: 3), E13R (ID SEC N°: 4),

T14K (ID SEC N°: 5), T14R (ID SEC N°: 6), H44K (ID SEC N°: 7),

H44R (ID SEC N°: 8), N74K (ID SEC N°: 9), N74R (ID SEC N°: 10),

S75K (ID SEC N°: 11), T205K (ID SEC N°: 12), T205R (ID SEC N°: 13),

E13R:N74K (ID SEC N°: 14), Q9R:E13R:N74K (ID SEC N°: 15),

E13R:N74K:T205K (ID SEC N°: 16), Q9R:E13R:N74K:T205K (ID SEC N°: 17).

La Figura 2 muestra las actividades de las variantes hiperactivas de DNasa I humana determinadas en un ensayo de digestión de ADN superenrollado y en un ensayo de digestión de ADN lineal, como se describe en el Ejemplo 3.

ES 2 301 180 T3

La Figura 3 muestra las actividades de las variantes hiperactivas de DNasa I humana determinadas en un ensayo de hipercromicidad, como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 4 muestra el porcentaje de actividad de la DNasa I humana nativa y de las variantes hiperactivas de DNasa I humana determinadas en presencia de diversas concentraciones de cloruro sódico en un ensayo de digestión de ADN lineal, como se describe en el Ejemplo 3. Los valores de porcentaje de actividad se expresan respecto de la actividad de cada DNasa I (nativa o variante) en ausencia de cloruro sódico añadido.

Descripción detallada

Como se usan aquí, las expresiones “DNasa I humana”, “DNasa I humana nativa” y “DNasa I de tipo natural” se refieren al polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la DNasa I humana madura expuesta en la Figura 1.

Una “variante” o “variante de secuencia de aminoácidos” de la DNasa I humana es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos diferente de la secuencia de la DNasa I humana nativa. En general, una variante poseerá una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 90%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 95%, y lo más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 98% con la DNasa I humana nativa. El porcentaje de identidad de secuencia se determina, por ejemplo, mediante la versión de Fitch, *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:1382-1386 (1983) del algoritmo descrito por Needleman, *et al.*, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970), tras alinear las secuencias para proporcionar una homología máxima.

Las expresiones “variante hiperactiva” y “variante hiperactiva de la DNasa I humana” se refieren a una variante de la DNasa I humana nativa que tiene una actividad hidrolítica de ADN incrementada en comparación con la DNasa I humana nativa.

“Actividad hidrolítica de ADN” se refiere a la actividad enzimática de la DNasa I humana nativa o de una variante de DNasa I humana en la hidrólisis del sustrato de ADN para proporcionar productos finales de oligonucleótidos 5'-fosforilados. La actividad hidrolítica de ADN se determina fácilmente mediante cualquiera de varios métodos diferentes conocidos en la técnica, que incluyen electroforesis analítica en gel de poli(acrilamida o de agarosa, ensayo de hipercromicidad, (Kunitz, J. Gen. Physiol. 33:349-362 (1950); Kunitz, J. Gen. Physiol. 33:363-377 (1950)), o ensayo con verde de metilo (Kurnick, Arch. Biochem. 29:41-53 (1950); Sinicropi, *et al.*, Anal. Biochem. 222:351-358 (1994)).

Una variante de DNasa I humana que tiene una “actividad hidrolítica de ADN incrementada” es una que hidroliza ADN en mayor medida que la DNasa I humana nativa, tal como se determina en condiciones comparables. Por ejemplo, si el ensayo de digestión de ADN lineal descrito en el Ejemplo 3 se usa para determinar la actividad hidrolítica de ADN, entonces una variante de DNasa I humana que tiene una actividad hidrolítica de ADN incrementada será una que tenga una actividad mayor que la DNasa I humana nativa en el ensayo, tal como se determina en condiciones comparables. En este ensayo, una variante hiperactiva de la DNasa I humana tendrá típicamente una actividad hidrolítica de ADN al menos un 50% mayor que la DNasa humana nativa, pero también se producen fácilmente variantes hiperactivas que tienen actividades hidrolíticas de ADN más de 10 veces mayores que la DNasa I humana nativa, especialmente alterando múltiples residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la DNasa I humana nativa (véase, p.ej., la Figura 2).

La “actividad mucolítica” se refiere a la reducción de la viscoelasticidad (viscosidad) del esputo o de otro material biológico, por ejemplo tal como se observa tras el tratamiento del material con DNasa I humana nativa o con una variante hiperactiva de la DNasa I humana. La actividad mucolítica se determina fácilmente mediante cualquiera de varios métodos diferentes conocidos en la técnica, que incluyen el ensayo de compactación de esputo (publicación de patente PCT n° WO 94/10567, publicada el 11 de mayo de 1994), y los ensayos que usan un péndulo de torsión (Janmey, J. Biochem. Biophys. Methods 22:41-53 (1991)), u otras metodologías reológicas.

La “reacción en cadena de la polimerasa”, o “PCR”, se refiere en general a un método para la amplificación *in vitro* de una secuencia de nucleótidos deseada, como se describe, por ejemplo, en la pat. de EE.UU. n° 4.683.195. En general, el método de PCR implica ciclos repetidos de síntesis mediante extensión de cebadores, mediante el uso de cebadores oligonucleotídicos capaces de hibridar preferentemente con un ácido nucleico molde.

“Célula”, “célula hospedadora”, “línea celular” y “cultivo de células” se usan de manera intercambiable aquí, y se debería entender que tales términos incluyen la descendencia que resulta del crecimiento o cultivo de una célula. “Transformación” y “transfección” se usan de manera intercambiable para referirse al proceso de introducción de ADN en una célula.

“Unido de manera operable” se refiere a la unión covalente de dos o más secuencias de ADN, por medio de ligadura enzimática o de otra manera, en una configuración relativa entre sí de forma que se puede llevar a cabo la función normal de las secuencias. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o secuencia líder secretora está unido de manera operable al ADN de un polipéptido si se expresa en forma de una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido de manera operable a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido de manera operable a una secuencia

ES 2 301 180 T3

codificante si está posicionado de forma que facilite la traducción. En general, “unido de manera operable” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. La unión se lleva a cabo mediante ligadura en sitios de restricción adecuados. Si tales sitios no existen, se usan adaptadores o moléculas espaciadoras oligonucleotídicas sintéticas junto con los métodos de ADN recombinante habituales.

Los aminoácidos se identifican aquí mediante las denominaciones de tres letras o de una letra, como sigue:

Asp	D	ácido aspártico	Ile	I	isoleucina
Thr	T	treonina	Leu	L	leucina
Ser	S	serina	Tyr	Y	tirosina
Glu	E	ácido glutámico	Phe	F	fenilalanina
Pro	P	prolina	His	H	histidina
Gly	G	glicocola	Lys	K	lisina
Ala	A	alanina	Arg	R	arginina
Cys	C	cisteína	Trp	W	triptófano
Val	V	valina	Gln	Q	glutamina
Met	M	metionina	Asn	N	asparagina

La presente invención se basa en el estudio de la estructura, actividad hidrolítica de ADN y actividad mucolítica de las variantes de secuencia de aminoácidos de la DNasa I humana. Las variantes hiperactivas de la presente invención tienen una actividad hidrolítica de ADN incrementada en comparación con la DNasa I humana nativa. La actividad hidrolítica de ADN incrementada se consigue preferiblemente realizando mutaciones en y/o alrededor de los residuos de aminoácidos de la DNasa I humana nativa que parecen afectar a la unión de ADN. Son especialmente útiles las mutaciones que introducen un residuo de aminoácido básico (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) en una o más posiciones de la DNasa I, en las que las cadenas laterales de los aminoácidos están en estrecha proximidad con el esqueleto de fosfato cargado negativamente del sustrato de ADN unido, que incluyen, por ejemplo, las posiciones de los residuos de aminoácidos Gln9, Glu13, Thr14, His44, Asn74, Ser75 y Thr205 de la DNasa I humana nativa (el número después de la denominación de aminoácidos de tres letras indica la posición específica del residuo de aminoácido en la secuencia de la Figura 1).

Existe una diversidad de formas en las que se pueden producir variantes hiperactivas de la DNasa I humana. En una realización de esta invención, se prepara una variante hiperactiva mediante la introducción de sustituciones, inserciones y/o deleciones únicas o múltiples de aminoácidos, en o adyacentes a (es decir, a menos de alrededor de cinco residuos de aminoácidos de) los residuos de aminoácidos de la DNasa I humana nativa que afectan a la unión del ADN. Algunos ejemplos ilustrativos de tales mutaciones son los siguientes: Q9R, E13K, E13R, T14K, T14R, H44K, H44R, N74K, N74R, S75K, T205K, T205R, E13R:N74K, Q9R:E13R:N74K, E13R:N74K:T205K, Q9R:E13R:N74K:T205K (véanse las Figuras 2 y 3).

En una realización adicional de esta invención, se usa la mutagénesis dirigida para introducir un residuo de aminoácido en o adyacente a (es decir, a menos de alrededor de cinco residuos de aminoácidos de) los residuos de aminoácidos de la DNasa I humana nativa que están implicados en la unión del ADN, y dicho residuo introducido es adecuado para la modificación postraduccional biológicamente o químicamente (véase más adelante). Means, *et al.*, *Chemical Modification of Proteins* (Holden-Day, 1971); Glazer, *et al.*, *Chemical Modification of Proteins: Selected Methods and Analytical Procedures* (Elsevier, 1975); Creighton, *Proteins*, págs. 70-87 (W.H. Freeman, 1984); Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification* (CRC Press, 1991). Por ejemplo, se puede producir una variante hiperactiva de la DNasa I humana haciendo modificaciones postraduccionales que incrementan la carga positiva neta en o de forma adyacente a (es decir, a menos de alrededor de cinco residuos de aminoácidos de) los residuos de aminoácidos de la DNasa I humana nativa que están implicados en la unión del ADN. Por ejemplo, se puede introducir un residuo de cisteína en o de forma adyacente a un residuo de la DNasa I humana nativa que está implicado en la unión del ADN. El tiol libre del residuo de cisteína se puede modificar después, por ejemplo, con un agente alquilante específico de tiol tal como etilenimina, lo que da como resultado la formación de S-aminoetilcisteína, que porta una carga positiva a pH neutro. Un ejemplo ilustrativo de tales mutaciones es H44C.

Por comodidad, las sustituciones, inserciones y/o deleciones de la secuencia de aminoácidos de la DNasa I humana nativa se realizan habitualmente mediante la introducción de mutaciones en la secuencia de nucleótidos correspondiente del ADN que codifica la DNasa I humana nativa, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida. La expresión del ADN mutado da como resultado la producción de la variante de DNasa I humana, que tiene la secuencia de aminoácidos deseada (no nativa).

ES 2 301 180 T3

Aunque se puede usar cualquier método conocido en la técnica para llevar a cabo la mutagénesis dirigida, p.ej. como se describe en Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989)), la mutagénesis dirigida mediante oligonucleótidos es el método preferido para preparar las variantes de DNasa I humana de esta invención. Este método, que se conoce bien en la técnica (Zoller, *et al.*, *Meth. Enz.* 100:4668-500 (1983); Zoller, *et al.*, *Meth. Enz.* 154:329-350 (1987); Carter, *Meth. Enz.* 154:382-403 (1987); Kunkel, *et al.*, *Meth. Enzymol.* 154:367-382 (1987); Horwitz, *et al.*, *Meth. Enz.* 185:599-611 (1990)), es particularmente adecuado para producir variantes por sustitución, aunque también se puede usar para preparar convenientemente variantes por delección e inserción.

El método de mutagénesis dirigida emplea típicamente un vector de fago que existe tanto en forma monocatenaria como bicatenaria. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis dirigida incluyen vectores tales como el fago M13, y vectores plasmídicos que contienen un origen de replicación de fago monocatenario (Messing, *et al.*, *Meth. Enzymol.* 101:20-78 (1983); Veira *et al.*, *Meth. Enzymol.* 153:3-11 (1987); Short, *et al.*, *Nuc. Acids. Res.* 16:7583-7600 (1988)). La replicación de estos vectores en células hospedadoras adecuadas da como resultado la síntesis de ADN monocatenario que se puede usar para la mutagénesis dirigida.

Brevemente, al llevar a cabo la mutagénesis dirigida del ADN que codifica la DNasa I humana nativa (o una variante suya), el ADN se altera hibridando primero un oligonucleótido que codifica la mutación deseada a una cadena simple del ADN. Después de la hibridación, se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena completa, mediante el uso del oligonucleótido hibridado como cebador, y mediante el uso de la cadena simple del ADN como molde. Así, el oligonucleótido que codifica la mutación deseada se incorpora en el ADN bicatenario resultante.

Se pueden preparar oligonucleótidos para el uso como sondas de hibridación o cebadores mediante cualquier método adecuado, tal como mediante purificación de un ADN natural o mediante síntesis *in vitro*. Por ejemplo, se sintetizan fácilmente oligonucleótidos mediante el uso de diversas técnicas de química orgánica, tal como describió Narang, *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68:90-98 (1979); Brown, *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68:109-151 (1979); Caruthers, *et al.*, *Meth. Enzymol.* 154:287-313 (1985). Se conoce la aproximación general para seleccionar una sonda de hibridación o un cebador adecuado. Keller, *et al.*, *DNA Probes*, págs. 11-18 (Stockton Press, 1989). Típicamente, la sonda de hibridación o el cebador contendrán 10-25 nucleótidos o más, e incluirán al menos 5 nucleótidos a cada lado de la secuencia que codifica la mutación deseada, para asegurar que el oligonucleótido hibridará de forma preferente en la localización deseada con la molécula molde de ADN monocatenario.

Por supuesto, se puede usar la mutagénesis dirigida para introducir múltiples mutaciones por sustitución, inserción o delección en un ADN de partida. Si los sitios a mutar están próximos entre sí, las mutaciones se pueden introducir de forma simultánea mediante el uso de un único oligonucleótido que codifica todas las mutaciones deseadas. Si los sitios a mutar están a cierta distancia entre sí (separados por más de alrededor de diez nucleótidos), sin embargo, es más difícil generar un único oligonucleótido que codifique todos los cambios deseados. En vez de ello, se puede emplear uno de dos métodos alternativos.

En el primer método, se genera un oligonucleótido distinto para cada mutación deseada. Los oligonucleótidos se hibridan después al ADN molde monocatenario de forma simultánea, y la segunda cadena de ADN que se sintetiza a partir del molde codificará todas las sustituciones de aminoácidos deseadas.

El método alternativo implica dos o más rondas de mutagénesis para producir la variante deseada. La primera ronda es, como se describió, para introducir una única mutación. La segunda ronda de mutagénesis utiliza el ADN mutado producido en la primera ronda de mutagénesis como molde. Así, este molde ya contiene una o más mutaciones. El oligonucleótido que codifica la(s) sustitución(es) de aminoácido(s) deseada(s) adicional(es) se hibrida después a este molde, y la cadena resultante de ADN codifica entonces las mutaciones tanto de la primera como de la segunda ronda de mutagénesis. Este ADN resultante se puede usar como molde en una tercera ronda de mutagénesis, y así sucesivamente.

La mutagénesis mediante PCR (Higuchi, en *PCR Protocols*, págs. 177-183 (Academic Press, 1990); Vallette, *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 17:723-733 (1989)) también es adecuada para producir las variantes de DNasa I humana. Brevemente, cuando se usan cantidades pequeñas de ADN molde como material de partida en una PCR, se pueden usar cebadores que difieren ligeramente en la secuencia de la región correspondiente del ADN molde para generar cantidades relativamente grandes de un fragmento de ADN específico que difiere de la secuencia molde solamente en las posiciones en las que los cebadores difieren del molde. Para la introducción de una mutación en un ADN plasmídico, por ejemplo, la secuencia de uno de los cebadores incluye la mutación deseada y está diseñada para hibridar con una cadena del ADN plasmídico en la posición de la mutación; la secuencia del otro cebador debe ser idéntica a una secuencia de nucleótidos de la cadena opuesta del ADN plasmídico, pero esta secuencia puede estar localizada en cualquier parte a lo largo del ADN plasmídico. Se prefiere, sin embargo, que la secuencia del segundo cebador esté localizada a menos de 200 nucleótidos desde la del primero, de forma que al final se puede secuenciar fácilmente la región amplificada completa del ADN delimitado por los cebadores. La amplificación mediante PCR con el uso de un par de cebadores como el descrito anteriormente da como resultado una población de fragmentos de ADN que difieren en la posición de la mutación especificada por el cebador, y posiblemente en otras posiciones, ya que la copia del molde es en cierta medida propensa a errores. Wagner, *et al.*, en *PCR Topics*, págs. 69-71 (Springer-Verlag, 1991).

ES 2 301 180 T3

Si la proporción de molde respecto del producto de ADN amplificado es extremadamente baja, la mayoría del producto de fragmentos de ADN incorpora la(s) mutación(es) deseada(s). Este producto de ADN se usa para sustituir la región correspondiente del plásmido que sirvió como molde para la PCR mediante el uso de métodos de ADN recombinante habituales. Se pueden introducir mutaciones en posiciones separadas de forma simultánea mediante el uso de un segundo cebador mutante, o mediante la realización de una segunda PCR con cebadores mutantes diferentes y mediante la ligadura de los dos fragmentos de PCR resultantes simultáneamente al fragmento plasmídico en una ligadura de tres (o más) partes.

Otro método para preparar variantes, la mutagénesis mediante casete, se basa en la técnica descrita por Wells *et al.*, *Gene*, 34:315-323 (1985). El material de partida es el plásmido (u otro vector) que comprende la secuencia de ADN a mutar. El/los codón(es) del ADN de partida a mutar está(n) identificado(s). Debe haber un único sitio de endonucleasa de restricción a cada lado de el/los sitio(s) de mutación identificado(s). Si no existen tales sitios de restricción, se pueden generar mediante el uso del método de mutagénesis mediado por oligonucleótidos anteriormente descrito para introducirlos en las localizaciones apropiadas del ADN. El ADN plasmídico se corta en estos sitios para linealizarlo. Se sintetiza un oligonucleótido bicatenario que codifica la secuencia del ADN entre los sitios de restricción pero que contiene la(s) mutación(es) deseada(s) mediante el uso de procedimientos habituales, en los que las dos cadenas del oligonucleótido se sintetizan por separado y después se hibridan mediante el uso de técnicas habituales. Este oligonucleótido bicatenario se denomina casete. Este casete está diseñado para tener extremos 5' y 3' que son compatibles con los extremos del plásmido linealizado, de forma que se puede ligar directamente al plásmido. El plásmido resultante contiene la secuencia de ADN mutada.

La presencia de mutación(es) en un ADN se determina mediante métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen la cartografía de restricción y/o la secuenciación de ADN. Un método preferido de secuenciación de ADN es el método de terminación de la cadena mediante didesoxi de Sanger, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72:3918-3921 (1979).

El ADN que codifica una variante de DNasa I humana se inserta en un vector replicable para el clonado o la expresión adicional. Los "vectores" son plásmidos y otros ADNs que son capaces de replicarse dentro de una célula hospedadora, y como tales, son útiles para llevar a cabo dos funciones junto con las células hospedadoras compatibles (un sistema vector-hospedador). Una función es facilitar el clonado del ácido nucleico que codifica una variante de DNasa I humana, es decir, para producir cantidades utilizables del ácido nucleico. La otra función es dirigir la expresión de una variante de DNasa I humana. Una o ambas de estas funciones son llevadas a cabo por el vector en la célula hospedadora particular usada para el clonado o la expresión. Los vectores contendrán diferentes componentes dependiendo de la función que deban llevar a cabo.

Para producir una variante de DNasa I humana, un vector de expresión comprenderá el ADN que codifica la variante, como se describió anteriormente, unido de forma operable a un promotor y a un sitio de unión al ribosoma. La variante se expresa después directamente en el cultivo de células recombinantes, o en forma de una fusión con un polipéptido heterólogo, preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en la unión entre el polipéptido heterólogo y la variante de DNasa I humana.

Los procariotas (p.ej., *E. coli* y otras bacterias) son las células hospedadoras preferidas para las etapas de clonado iniciales de esta invención. Son particularmente útiles para la producción rápida de grandes cantidades de ADN, para la producción de los moldes de ADN monocatenario usados para la mutagénesis dirigida, y para la secuenciación del ADN de las variantes generadas. También se pueden usar células hospedadoras procarióticas para la expresión del ADN que codifica una variante de DNasa I humana. Los polipéptidos que se producen en las células procarióticas estarán típicamente sin glicosilar.

Además, las variantes de DNasa I humana de esta invención se pueden expresar en células hospedadoras eucarióticas, lo que incluye los microbios eucarióticos (p.ej., levaduras) o las células derivadas de un animal o de otro organismo multicelular (p.ej., células de ovario de hámster chino, y otras células de mamíferos), o en animales vivos (p.ej., vacas, cabras, ovejas).

Las metodologías de clonado y de expresión se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de células hospedadoras procarióticas y eucarióticas y de vectores de expresión adecuados para el uso en la producción de las variantes de DNasa I humana de la presente invención son, por ejemplo, los descritos en Shak, publicación de patente PCT n° WO 90/07572 (publicada el 12 de julio de 1990).

Si se usan como hospedadores células procarióticas o células que contienen paredes celulares considerables, los métodos preferidos de transfección de las células con el ADN son el método de tratamiento con calcio descrito por Cohen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69:2110-2114 (1972) o el método de polietilenglicol de Chung *et al.*, *Nuc. Acids. Res.* 16:3580 (1988). Si se usan levaduras como hospedador, la transfección se lleva a cabo generalmente mediante el uso de polietilenglicol, como enseñó Hinnen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 1929-1933 (1978). Si se usan células mamíferas como células hospedadoras, la transfección se lleva a cabo generalmente mediante el método de precipitación con fosfato cálcico, Graham, *et al.*, *Virology* 52:546 (1978), Gorman, *et al.*, *DNA and Protein Eng. Tech.* 2:3-10 (1990). Sin embargo, también son adecuados para el uso en esta invención otros métodos conocidos para la introducción de ADN en células procarióticas y eucarióticas, tales como la inyección nuclear, la electroporación o la fusión de protoplastos.

En esta invención son particularmente útiles los vectores de expresión que proporcionan la expresión transitoria del ADN que codifica las variantes de DNasa I humana en células mamíferas. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que es capaz de replicarse de manera eficaz en una célula hospedadora, de forma que la célula hospedadora acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza niveles elevados de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión. Los sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión y una célula hospedadora adecuados, permiten la identificación positiva adecuada de los polipéptidos codificados por los ADNs clonados, así como el cribado rápido de tales polipéptidos en función de las propiedades biológicas o fisiológicas deseadas. Wong, *et al.*, Science 228:810-815 (1985); Lee, *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:4360-4364 (1985); Yang, *et al.*, Cell 47:3-10 (1986). Así, los sistemas de expresión transitoria se usan de manera adecuada para la expresión del ADN que codifica las variantes de secuencia de aminoácidos de la DNasa I humana nativa, junto con los ensayos para identificar las variantes que tienen una actividad hidrolítica de ADN incrementada.

Una variante de DNasa I humana preferiblemente se secreta de la célula hospedadora en la que se expresa, en cuyo caso la variante se recupera del medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. En ese caso, puede ser deseable cultivar las células en un medio de cultivo exento de suero, ya que la ausencia de proteínas del suero y de otros componentes del suero en el medio puede facilitar la purificación de la variante. Si no se secreta, entonces la variante de DNasa I humana se recupera de los lisados de las células hospedadoras. Cuando la variante se expresa en una célula hospedadora que no es de origen humano, la variante estará completamente exenta de proteínas de origen humano. En todo caso, será necesario purificar la variante de las proteínas de las células recombinantes para obtener preparaciones sustancialmente homogéneas de la variante de DNasa I humana. Para usos terapéuticos, la variante purificada tendrá preferiblemente una pureza de más del 99% (es decir, cualquier otra proteína comprenderá menos del 1% de la proteína total de la composición purificada).

En general, la purificación de una variante de DNasa I humana se lleva a cabo aprovechando las propiedades físico-químicas diferenciales de la variante en comparación con los contaminantes con los que puede estar asociada. Por ejemplo, como primera etapa, el medio de cultivo o el lisado de células hospedadoras se centrifuga para eliminar los residuos celulares particulados. La variante de DNasa I humana se purifica después de las proteínas y polipéptidos solubles contaminantes, por ejemplo mediante precipitación con sulfato amónico o etanol, filtración en gel (cromatografía de exclusión molecular), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica, cromatografía por inmunoafinidad (p.ej., mediante el uso de una columna que comprende anticuerpos anti-DNasa I humana acoplados a Sepharose), cromatografía de intercambio catiónico de tentáculo (Frenz, *et al.*, publicación de patente PCT n° WO 93/25670, publicada el 23 de diciembre de 1993), HPLC de fase inversa, y/o electroforesis en gel.

Por supuesto, un experto en la técnica apreciará que los métodos de purificación que se usan para la DNasa I humana nativa pueden requerir ciertas modificaciones para ser útiles en la purificación de una variante de DNasa I humana, para adaptarse a las diferencias estructurales y de otro tipo entre las proteínas nativas y las variantes. Por ejemplo, en algunas células hospedadoras (especialmente en células hospedadoras bacterianas) la variante de DNasa I humana se puede expresar inicialmente en una forma insoluble, agregada (denominada en la técnica "cuerpos refringentes" o "cuerpos de inclusión") en cuyo caso será necesario solubilizar y renaturalizar la variante de DNasa I humana en el curso de su purificación. Los métodos para solubilizar y renaturalizar los cuerpos refringentes de proteína recombinante se conocen en la técnica (véase, p.ej., Builder, *et al.*, pat. de EE.UU. n° 4.511.502).

En otra realización de esta invención, se hacen modificaciones covalentes a la proteína DNasa I humana nativa o variante para incrementar la actividad hidrolítica de ADN de la proteína o para modificar otra propiedad de la proteína (p.ej., la estabilidad, la semivida biológica, la inmunogenicidad). Tales modificaciones covalentes se pueden hacer en vez de o además de las mutaciones por sustitución, inserción y delección en la secuencia de aminoácidos descritas anteriormente.

Las modificaciones covalentes se pueden introducir haciendo reaccionar los residuos de aminoácidos seleccionados como objetivo de la DNasa I humana nativa o variante con un agente derivatizante orgánico, que es capaz de reaccionar con las cadenas laterales de los aminoácidos o con los residuos N- o C-terminales seleccionados. Los agentes derivatizantes y los métodos adecuados se conocen bien en la técnica.

Por ejemplo, los residuos de cisteinilo se hacen relacionar habitualmente con α -haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para proporcionar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos de cisteinilo se derivatizan también mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozoi)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos de histidilo se derivatizan mediante reacción con pirocarbonato de dietilo a pH 5,5-7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. También es útil bromuro de para-bromofenacilo; la reacción se lleva a cabo preferiblemente en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0.

El lisinilo y los residuos aminoterminales se hacen reaccionar con anhídrido succínico u otros anhídridos de ácidos carboxílicos. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen α -amino incluyen los imidoésteres tales como picolinimi-

ES 2 301 180 T3

dato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y la reacción catalizada mediante transaminasa con glioxilato.

5 Los residuos de arginilo se modifican mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de los residuos de arginina requiere de la reacción se lleve a cabo en condiciones alcalinas debido al elevado pK_a del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como con el grupo ϵ -amino de la arginina.

10 Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican de manera selectiva mediante reacción con carbodiimidas ($R-N=C=N-R'$), en las que R y R' son grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo se convierten en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio.

15 Se puede usar el acoplamiento covalente de glicósidos a residuos de aminoácidos de una proteína DNasa I humana nativa o variante para modificar o incrementar el número o perfil de sustituyentes de carbohidrato, especialmente en, o cerca de, los residuos que están implicados en la unión de ADN. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el/los azúcar(es) se puede(n) unir a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de glutamina. Se describen métodos adecuados, por ejemplo, en la publicación de patente PCT n° WO 87/05330 (publicada el 11 de septiembre de 1987), y en Aplin, *et al.*, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306 (1981).

20 La unión covalente de agentes tales como polietilenglicol (PEG) o albúmina de suero humano a las variantes de DNasa I humana puede reducir la inmunogenicidad y/o la toxicidad de la variante y/o prolongar su semivida, como se ha observado para otras proteínas. Abuchowski, *et al.*, J. Biol. Chem. 252:3582-3586 (1977); Poznansky, *et al.*, FEBS Letters 239:18-22 (1988); Goodson, *et al.*, Biotechnology 8:343-346 (1990); Katre, J. Immunol. 144:209-213 (1990); Harris, *Polyethylene Glycol Chemistry* (Plenum Press, 1992).

30 En una realización adicional de esta invención, una variante hiperactiva de DNasa I humana comprenderá una o más mutaciones adicionales de la secuencia de aminoácidos u otras modificaciones covalentes que provocan que la variante tenga una afinidad de unión reducida para la actina. Los ejemplos de tales mutaciones y modificaciones covalentes que reducen la unión de actina se describen en la publicación de patente PCT WO 96/26279. Una variante hiperactiva puede comprender también una mutación de la secuencia de aminoácidos u otra modificación covalente que reduce la susceptibilidad de la variante a la degradación mediante proteasas (p.ej., elastasa de neutrófilos) que pueden estar presentes en el esputo y en otros materiales biológicos.

40 Las actividades hidrolíticas de ADN de las variantes de DNasa I humana preparadas como se describió anteriormente se determinan fácilmente mediante el uso de ensayos y métodos conocidos en la técnica y como se describe aquí. Cualquier variante que tenga una actividad hidrolítica de ADN incrementada (como se define aquí) es una variante hiperactiva dentro del alcance de esta invención.

45 Se producen anticuerpos hacia variantes hiperactivas de DNasa I humana mediante inmunización de un animal con una variante hiperactiva o un fragmento suyo, opcionalmente junto con un polipéptido inmunógeno, y después mediante la recuperación de los anticuerpos del suero de los animales inmunizados. De forma alternativa, se preparan anticuerpos monoclonales a partir de células de los animales inmunizados de una forma convencional. Los anticuerpos se pueden hacer también en forma de anticuerpos quiméricos (p.ej., humanizados) o de cadena única o fragmentos Fab, mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, los anticuerpos se unirán a la variante hiperactiva, pero no se unirán sustancialmente a (es decir, no reaccionarán de manera cruzada con) otras proteínas DNasas (tales como la DNasa I humana y bovina nativas). Los anticuerpos se pueden usar en métodos relacionados con la localización y actividad de la variante hiperactiva, por ejemplo, para detectar y medir sus niveles en tejidos o muestras clínicas. Los anticuerpos inmovilizados son particularmente útiles en la detección de la variante hiperactiva en muestras clínicas para fines diagnósticos, y en la purificación de la variante hiperactiva, por ejemplo a partir de cultivos de células recombinantes.

55 Las variantes hiperactivas de DNasa I humana que proporciona esta invención se usan para reducir la viscoelasticidad del material que contiene ADN, que incluye esputo, mucosidad u otras secreciones pulmonares. Tales variantes son particularmente útiles para el tratamiento de pacientes con enfermedad pulmonar que tienen secreciones anormales viscosas o espesas, y trastornos tales como bronconeumopatía aguda o crónica, que incluye neumonía infecciosa, bronquitis o traqueobronquitis, bronquiectasia, fibrosis quística, asma, tuberculosis e infecciones fúngicas. Para tales terapias, se instala una disolución o una preparación seca finamente dividida de la variante hiperactiva de una forma convencional en las vías respiratorias (p.ej., bronquios) o pulmones de un paciente, por ejemplo mediante aplicación con aerosol.

65 Las variantes hiperactivas son también útiles para el tratamiento complementario de abscesos o infecciones graves en espacios cerrados en trastornos tales como empiema, meningitis, abscesos, peritonitis, sinusitis, otitis, periodontitis, pericarditis, pancreatitis, coledocistitis, endocarditis y artritis séptica, así como en tratamientos tópicos en una diversidad de lesiones inflamatorias e infectadas tales como las lesiones infectadas de la piel y/o de las membranas mucosas, heridas quirúrgicas, lesiones ulcerativas y quemaduras. La variante hiperactiva puede mejorar la eficacia de los anti-

ES 2 301 180 T3

bióticos usados en el tratamiento de tales infecciones (p.ej., la actividad de gentamicina se reduce notablemente por la unión reversible al ADN intacto).

Las variantes hiperactivas de la DNasa I humana serán útiles para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico (LES), una enfermedad autoinmunitaria potencialmente mortal caracterizada por la producción de diversos autoanticuerpos. El ADN es un componente antigénico importante de los complejos inmunitarios. En este caso, la DNasa I humana hiperactiva (nativa o variante) se puede administrar de forma sistémica, por ejemplo mediante administración intravenosa, subcutánea, intratecal o intramuscular al paciente afectado.

Las variantes hiperactivas de la DNasa I humana serán útiles también para prevenir el desarrollo nuevo y/o la exacerbación de infecciones respiratorias, tal como puede ocurrir en pacientes que tienen fibrosis quística, bronquitis crónica, asma, neumonía u otras enfermedades pulmonares, o en pacientes cuya respiración se asiste mediante respirador u otro dispositivo mecánico, o en otros pacientes que tienen un riesgo de desarrollar infecciones respiratorias, por ejemplo pacientes posquirúrgicos.

Las variantes hiperactivas de la invención se pueden formular según métodos conocidos para preparar composiciones terapéuticamente útiles. Una composición terapéutica preferida es una solución de una variante hiperactiva en una solución acuosa tamponada o sin tamponar, y preferiblemente es una solución salina isotónica tal como cloruro sódico 150 mM que contiene cloruro cálcico 1,0 mM a pH 7. Estas soluciones son particularmente adaptables para el uso en nebulizadores disponibles comercialmente, que incluyen nebulizadores de chorro y nebulizadores ultrasónicos útiles para la administración directa en las vías respiratorias o pulmonares de un paciente afectado.

En otra realización, la composición terapéutica comprende un polvo seco de la variante hiperactiva, preparado preferiblemente mediante secado por pulverización de una solución de la variante, esencialmente como se describió en la publicación de patente PCT WO 95/23613.

En una realización adicional, la composición terapéutica comprende células que producen activamente una variante hiperactiva de la DNasa I humana. Tales células se pueden introducir directamente en el tejido de un paciente, o se pueden encapsular dentro de membranas porosas que se implantan después en un paciente, por lo que proporcionan en cada caso la administración de la variante hiperactiva en áreas del cuerpo del paciente que necesitan una actividad hidrolítica de ADN incrementada. Por ejemplo, las células del propio paciente se podrían transformar, *in vivo* o *ex vivo*, con ADN que codifica una variante hiperactiva de la DNasa I humana, y después usarlas para producir la variante de DNasa I directamente dentro del paciente. Este último método se denomina habitualmente terapia génica.

La cantidad terapéuticamente eficaz de una variante hiperactiva de DNasa I humana dependerá, por ejemplo, de la cantidad de ADN en el material a tratar, los objetivos terapéuticos, la vía de administración y el trastorno del paciente. Por lo tanto, será necesario que el terapeuta determine la dosis y modifique la vía de administración según sea necesario para obtener el efecto terapéutico óptimo. En vista de su actividad hidrolítica de ADN incrementada, la cantidad de la variante hiperactiva necesaria para conseguir un efecto terapéutico puede ser menor que la cantidad de DNasa I humana nativa necesaria para conseguir el mismo efecto en las mismas condiciones. En general, la cantidad terapéuticamente eficaz de la variante hiperactiva será una dosis de alrededor de 0,1 μg a alrededor de 5 mg de la variante por kilogramo de peso corporal del paciente, administrada en composiciones farmacéuticas, como se describe aquí.

Una variante de DNasa I humana hiperactiva se combina o se administra opcionalmente de forma coordinada con uno o más agentes farmacológicos distintos usados para tratar los trastornos enumerados anteriormente, tales como antibióticos, broncodilatadores, agentes antiinflamatorios, mucolíticos, (p.ej., N-acetil-cisteína), proteínas de unión a actina o de fragmentación de actina (p.ej., gelsolina; Matsudaira *et al.*, Cell 54:139-140 (1988); Stossel, *et al.*, publicación de patente PCT n° WO 94/22465 (publicada el 13 de octubre de 1994)), inhibidores de proteasas, productos de terapia génica (p.ej., que comprenden el gen del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), Riordan, *et al.*, Science 245:1066-1073 (1989)), glucocorticoides o agentes citotóxicos.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración solamente, y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1

Mutagénesis de la DNasa I humana

Se transformó la cepa CJ236 de *E. coli* (BioRad Laboratories, Richmond, California, EE.UU.) con el plásmido pRK.DNase.3 mediante el uso del método de Chung *et al.* (Nuc. Acids. Res. 16:3580 (1988)). El plásmido pRK.DNase.3 usado en la presente invención es como se describe en la publicación de patente PCT n° WO 90/07572 (publicada el 12 de julio de 1990), excepto que la secuencia nucleotídica que codifica la DNasa I humana madura es como se muestra en la Figura 1A de Shak, *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. 87:9188-9192 (1990). Las células transformadas se colocaron en placas de agar LB que contenían 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de carbenicilina y se cultivaron durante la noche a 37°C. El caldo 2YT (5 ml) que contenía 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de carbenicilina y 10 μl de fago auxiliar VCSM13 (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) se inoculó con una colonia individual de la placa de agar y se cultivó durante la noche a 37°C con agitación. Se aisló ADN monocatenario a partir de este cultivo y se usó como molde para la mutagénesis posterior.

ES 2 301 180 T3

La mutagénesis dirigida se llevó a cabo mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos según el método de Kunkel, *et al.* (Meth. Enzymol. 154: 367-382 (1987)). Los oligonucleótidos mutagénicos fueron moléculas de 27 unidades monoméricas que tenían 12 emparejamientos exactos de bases en 5' del codón sin emparejar y 12 emparejamientos exactos de bases en 3' respecto del codón sin emparejar. Tras la mutagénesis, el ADN monocatenario de los clones individuales se sometió a secuenciación mediante el método didesoxi (Sanger, *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467 (1977)). El ADN que tenía secuencias nucleotídicas de la variante se transformó después como se describió anteriormente en la cepa de *E. coli* XL1 Blue MRF⁺ (Stratagene). Después de la colocación en placas y del aislamiento de colonias únicas como anteriormente, se usaron las colonias individuales para inocular 0,5 litros de caldo LB que contenía 50 µg/ml de carbenicilina. Después de cultivar durante la noche con agitación a 37°C, las células se recogieron mediante centrifugación y se purificó el ADN de la variante (en el vector de expresión) mediante el uso de columnas tip-500 de Qiagen (Qiagen Inc., Chatsworth, California, EE.UU.).

Las Figuras 2 y 3 identifican las diferentes variantes de DNasa I humana que se produjeron. En las figuras y a lo largo de la memoria descriptiva, la descripción de la(s) mutación(es) por sustitución de aminoácido(s) presente(s) en una variante de DNasa I se abrevia(n) mediante una primera letra del alfabeto, un número, y una segunda letra del alfabeto. La primera letra del alfabeto es una abreviatura de una letra del residuo de aminoácido de la DNasa I humana madura nativa (de tipo natural), el número indica la posición de ese residuo en la DNasa I humana madura nativa (la numeración es la mostrada en la Figura 1), y la segunda letra del alfabeto es la abreviatura de una letra del residuo de aminoácido en esa posición en la variante de DNasa I. Por ejemplo, en la variante de DNasa I que tiene una mutación E13R, el residuo de ácido glutámico (E) de la posición 13 de la DNasa I humana madura nativa se ha sustituido por un residuo de arginina (R). Las mutaciones múltiples en una única variante se denominan de manera similar, con dos puntos (:) que separan cada una de las diferentes mutaciones que están presentes en la variante. Por ejemplo, la denominación E13R:N74K indica que la variante tiene una mutación E13R y una mutación N74K.

Ejemplo 2

Expresión de variantes de DNasa I humana

Se cultivaron células 293 de riñón embrionario humano (ATCC CRL 1573, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU.) en medio que contenía suero en placas Petri de plástico de 150 mm. Las células de la fase logarítmica se cotransfectaron de manera transitoria con 22,5 µg de ADN purificado de variante (preparado como se describió anteriormente) y 17 µg de ADN de adenovirus mediante el uso del método de precipitación con fosfato cálcico (Gorman, *et al.*, DNA and Protein Eng. Tech. 2:3-10 (1990)). Aproximadamente 16 horas después de la transfección, las células se lavaron con 15 ml de solución salina tamponada con fosfato y los medios se cambiaron por medios exentos de suero. Los medios de los cultivos celulares se recogieron de cada placa aproximadamente 96 horas después del cambio por medios exentos de suero. Se obtuvo un total de aproximadamente 25 ml de sobrenadante de los cultivos celulares que contenían la variante de DNasa I de esta manera. La mezcla de sobrenadantes de los cultivos de cada placa se concentró alrededor de 10 veces mediante el uso de concentradores Centriprep 10. La concentración de proteína DNasa I en los concentrados se determinó mediante el uso de un ELISA de proteína DNasa I como se describió en la publicación de patente PCT WO 96/26279.

Se preparó el sobrenadante del cultivo que contenía DNasa I humana nativa mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente, excepto que las células 293 se transfectaron de manera transitoria con el plásmido pRK.DNase.3.

Ejemplo 3

Actividades bioquímicas de las variantes de DNasa I humana

I. Ensayos de digestión de ADN plasmídico

Se usaron dos ensayos diferentes de digestión de plásmidos para determinar la actividad hidrolítica de ADN de las variantes de DNasa I humana. El primer ensayo ("ensayo de digestión de ADN superenrollado") midió la conversión del ADN del plásmido pBR322 bicatenario superenrollado en formas relajadas (melladas), lineales y degradadas. El segundo ensayo ("ensayo de digestión de ADN lineal") midió la conversión de ADN de pBR322 bicatenario lineal en formas degradadas.

En concreto, se añadieron los sobrenadantes de los cultivos (preparados como se describió anteriormente, y diluidos aproximadamente 1:1000 antes del uso) a 160 µl de solución que contenía 25 µg/ml de ADN de pBR322 superenrollado o ADN de pBR322 linealizado digerido con EcoRI en HEPES 25 mM, pH 7,1, 100 µg/ml de albúmina de suero bovino, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2,5 mM, NaCl 150 mM, y las muestras se incubaron a temperatura ambiente. Se extrajeron alícuotas de las mezclas de reacción en diversos momentos y se pararon mediante la adición de EDTA 25 mM, junto con xileno-cianol, azul de bromofenol y glicerol. Se analizó la integridad del ADN de pBR322 en las muestras paradas mediante electroforesis de las muestras en geles de agarosa del 0,8% peso/vol. Después de la electroforesis los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio y se visualizó el ADN en los geles mediante luz ultravioleta. Se determinaron las cantidades relativas de las formas superenrolladas, relajadas y lineales del ADN de pBR322 mediante el barrido de los geles con un FluorImager modelo 575 de Molecular Dynamics y mediante la cuantificación de la cantidad de ADN en las bandas del gel que correspondía a las diferentes formas.

ES 2 301 180 T3

Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 2. En el ensayo de digestión de ADN superenrollado, la actividad global de las variantes de DNasa I humana se midió como la velocidad inicial de desaparición del ADN superenrollado (como resultado de la conversión de éste en ADN relajado (mellado), lineal o degradado), normalizada respecto de la velocidad observada con la DNasa I humana nativa (“actividad relativa de mella”). También se determinó la proporción de formas linealizadas respecto de relajadas del ADN de pBR322 respecto de la observada con la DNasa I humana nativa (“proporción L/R”). En el ensayo de digestión de ADN lineal, la actividad de las variantes de DNasa I humana se midió como la velocidad inicial de desaparición del ADN lineal (como resultado de su conversión en formas degradadas), normalizada respecto de la velocidad observada con la DNasa I humana nativa (“actividad relativa de digestión de ADN lineal”). En el ensayo de digestión de ADN superenrollado, la DNasa I humana nativa tuvo una actividad de mella de ADN superenrollado de 1200 ± 43 mg de ADN $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de DNasa I (n=2), y dio una proporción de producto lineal respecto de relajado de 0,010. En el ensayo de digestión de ADN lineal, la DNasa I humana nativa tuvo una actividad de digestión de ADN lineal de 23 ± 3 mg de ADN $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de DNasa I (n=6).

II. Ensayo de hipercromicidad

También se determinó la actividad hidrolítica de ADN de la DNasa I humana mediante el uso de un ensayo de hipercromicidad, que se basa en el incremento de la absorbancia a 260 nm tras la desnaturalización y despolimerización del ADN (Kunitz, J. Gen. Physiol. 33:349-362 (1950); Kunitz, J. Gen. Physiol. 33:363-377 (1950)).

En el ensayo de hipercromicidad, se añadieron los sobrenadantes de los cultivos (preparados como se describió anteriormente, y diluidos aproximadamente 1:2 a 1:50 antes del uso) a 150 μl de solución que contenía 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN de timo de ternero en HEPES 25 mM, pH 7,1, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 2,5 mM, NaCl 150 mM, y se monitorizó el incremento de la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro (Spectra Max 250 de Molecular Devices) durante seis minutos. Las representaciones de la actividad frente a la concentración de ADN fueron hiperbólicas, y los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menton para generar los valores cinéticos de K_m y V_{max} . La Figura 3 muestra los valores de $1/K_m$, V_{max} , y V_{max}/K_m calculados para las variantes de DNasa I humana que están normalizados respecto de los de la DNasa I humana nativa. En este ensayo, la DNasa I humana nativa tuvo una K_m de 229 ± 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN (n=6) y una V_{max} de 168 ± 18 unidades de $A_{260} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de DNasa I (n=6).

III. Efecto del cloruro sódico sobre la actividad hidrolítica de ADN

Se determinó el efecto del cloruro sódico sobre la actividad hidrolítica de ADN de varias variantes de DNasa I humana mediante el uso del ensayo de digestión de ADN lineal esencialmente como se describió anteriormente, excepto que se añadió cloruro sódico a las mezclas de reacción hasta una concentración final de 20 mM a 400 mM. La Figura 4 muestra el porcentaje de actividad de las variantes hiperactivas y de la DNasa I humana nativa a diversas concentraciones de cloruro sódico respecto de sus actividades respectivas en ausencia de cloruro sódico añadido.

REIVINDICACIONES

5 1. Una variante de DNasa I humana que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos de la DNasa I humana nativa mostrada en la Figura 1, que comprende además una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Q9R, E13K, T14K, T14R, H44K, H44R, N74K, N74R, S75K, T205K y T205R; en la que dicha variante tiene una actividad hidrolítica de ADN mayor que la DNasa I humana nativa.

10 2. La variante de la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95% con la secuencia de aminoácidos de la DNasa I humana nativa mostrada en la Figura 1.

3. La variante de la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 98% con la secuencia de aminoácidos de la DNasa I humana nativa mostrada en la Figura 1.

15 4. La variante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: E13R:N74K, Q9R:E13R:N74K, E13R:N74K:T205K, Q9R:E13R:N74K:T205K.

20 5. La variante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de ID SEC N°:2, ID SEC N°:3, ID SEC N°:5, ID SEC N°:6, ID SEC N°:7, ID SEC N°:8, ID SEC N°:9, ID SEC N°:10, ID SEC N°:11, ID SEC N°:12, ID SEC N°:13, ID SEC N°:14, ID SEC N°:15, ID SEC N°:16 e ID SEC N°:17.

25 6. Un ácido nucleico aislado que codifica una variante de DNasa I humana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. El uso de una variante de DNasa I humana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno pulmonar.

8. El uso de la reivindicación 7, en el que la enfermedad o el trastorno es fibrosis quística.

30 9. El uso de una variante de DNasa I humana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico.

35 10. Una composición farmacéutica que comprende una variante de DNasa I humana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

DNasa I humana madura

```
      10      20      30      40      50
LKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRVDIALVQEVRDShLTAVGK
      60      70      80      90     100
LLDNLNQDAPDtyHYVvSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDG
     110     120     130     140     150
CEPCGNDTFNREPAIVRFFSRFTEVREFAIvPLHAAPGDAVAEIDALYDV
     160     170     180     190     200
YLDVQEKWGLEdVMLMGDFNAGCSYVRPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSA
     210     220     230     240     250
DTTATPTHcAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNFQAAYGLSDQLAQaIS
     260
DHYPVEVMLK
```

Figura 2

Ensayos de digestión de ADN plasmídico

Variantes de DNasa I	Ensayo de digestión de ADN lineal	Ensayo de digestión de ADN superenrollado	
	Actividad relativa de digestión de ADN lineal	Proporción L/R	Actividad relativa de mella
DNasa I humana nativa	1.0 ± 0.1	1.0	1.0 ± 0.0
Q9R	3.5 ± 0.4	2.3	3.4 ± 0.5
E13K	3.9 ± 0.1		
E13R	6.0 ± 0.5	5.4	2.2 ± 0.0
T14K	4.2 ± 0.1	4.7	2.9 ± 0.8
T14R	3.5 ± 0.7		
H44K	2.0 ± 0.4	2.3	1.8 ± 0.3
H44R	3.6 ± 0.5		
N74K	6.0 ± 0.1	4.7	7.3 ± 1.0
N74R	4.1 ± 0.8		
S75K	1.5 ± 0.2		
T205K	4.7 ± 0.2	5.4	2.8 ± 0.7
T205R	2.3 ± 0.3		
E13R:N74K	26.7 ± 4.1	12.3	6.9 ± 1.6
Q9R:E13R:N74K	38.3 ± 1.2	16.5	6.3 ± 2.2
E13R:N74K:T205K	19.5 ± 6.4		
Q9R:E13R:N74K:T205K	30.5 ± 7.5		

Todos los datos están normalizados respecto de DNasa I humana nativa.

Figura 3

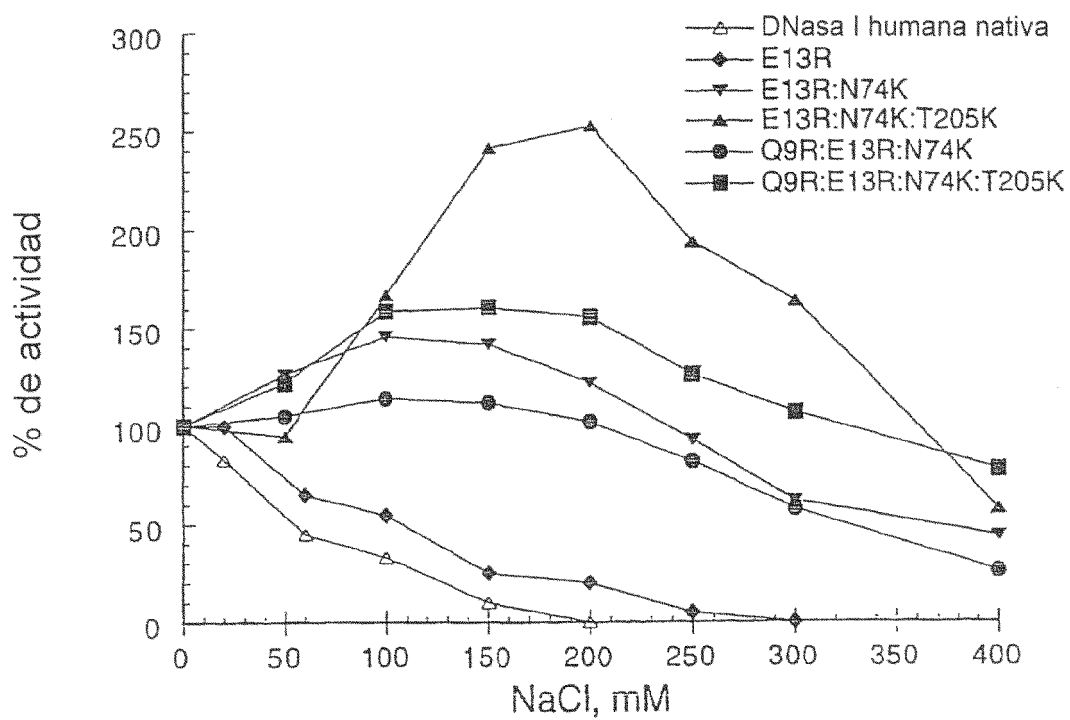
Ensayo de hiper Cromicidad de ADN

Variantes de DNasa I	$1/K_m$	V_{max}	V_{max}/K_m
DNasa I humana nativa	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0
Q9R	0.9 ± 0.2	2.8 ± 0.4	2.6
E13K	2.5 ± 0.4	1.8 ± 0.1	4.5
E13R	4.3 ± 1.4	1.5 ± 0.1	6.5
T14K	2.3 ± 0.9	1.1 ± 0.2	2.5
T14R	2.1 ± 0.8	0.7 ± 0.1	1.5
H44K	2.3 ± 0.5	1.1 ± 0.1	2.5
H44R	1.7 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.7
N74K	0.4 ± 0.2	5.5 ± 1.3	2.3
N74R	2.6 ± 0.8	3.1 ± 0.3	8.1
S75K	18.5 ± 2.0	0.4 ± 0.1	7.4
T205K	2.4 ± 0.8	2.1 ± 0.4	5.0
T205R	3.0 ± 1.2	1.0 ± 0.1	3.0
E13R:N74K	5.0 ± 1.7	5.3 ± 0.5	26.5
Q9R:E13R:N74K	4.9 ± 1.3	7.0 ± 0.4	34.3
E13R:N74K:T205K	5.0 ± 1.9	6.3 ± 0.6	31.5
Q9R:E13R:N74K:T205K	5.6 ± 1.4	3.8 ± 0.3	21.3

Todos los datos están normalizados respecto de DNasa I humana nativa.

Figura 4

Efecto de NaCl sobre las variantes de DNasa I humana



ES 2 301 180 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Genentech, Inc.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: VARIANTES HIPERACTIVAS DE DNASA I HUMANA
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 17
- 10 (iv) DIRECCIÓN POSTAL:
- (A) DESTINATARIO: Genentech, Inc.
 - (B) CALLE: 460 Point San Bruno Blvd
 - 15 (C) CIUDAD: South San Francisco
 - (D) ESTADO: California
 - (E) PAÍS: EE.UU.
 - (F) ZIP: 94080
- 20 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible de 3,5 pulgadas, 1,44 Mb
 - (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
 - 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOPORTE INFORMÁTICO: WinPatin (Genentech)
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD EN CURSO:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 09-JUN-1997
 - (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/663831
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 14-JUN-1996
- 40 (viii) INFORMACIÓN DEL REPRESENTANTE/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Johnston, Sean A.
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 35.910
 - 45 (C) NUMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: P1042PCT
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- (A) TELÉFONO: 415/225-3562
 - 50 (B) TELEFAX: 415/952-9881
 - (C) TELEX: 910/371-7168

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:1:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
 - (B) TIPO: Aminoácido
 - 60 (D) TOPOLOGÍA: Lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:1:
- 65

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N:2:

	Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Arg	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Lys
	1				5					10					15
5	Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser
					20					25					30
15	Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	His	Leu
					35					40					45
20	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro
					50					55					60
25	Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser
					65					70					75
30	Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser
					80					85					90
35	Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly
					95					100					105
40	Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser
					110					115					120
45	Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala
					125					130					135
50	Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val
					140					145					150
55	Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu
					155					160					165
60	Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
					170					175					180
65	Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu
					185					190					195
70	Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	His	Cys	Ala
					200					205					210
75	Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val
					215					220					225
80	Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly
					230					235					240
85	Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val
					245					250					255
90	Glu	Val	Met	Leu	Lys										
					260										

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:3:

	Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Gln	Thr	Phe	Gly	Lys	Thr	Lys	
	1				5					10					15	
15	Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser	
					20					25					30	
20	Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	His	Leu	
					35					40					45	
25	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	
					50					55					60	
30	Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	
					65					70					75	
35	Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser	
					80					85					90	
40	Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly	
					95					100					105	
45	Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser	
					110					115					120	
50	Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala	
					125					130					135	
55	Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val	
					140					145					150	
60	Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu	
					155					160					165	
65	Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln	
					170					175					180	
70	Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu	
					185					190					195	
75	Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	His	Cys	Ala	
					200					205					210	
80	Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val	
					215					220					225	
85	Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly	
					230					235					240	
90	Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val	
					245					250					255	
95	Glu	Val	Met	Leu	Lys											
					260											

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:4:

5		Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Gln	Thr	Phe	Gly	Arg	Thr	Lys
		1				5					10					15
15		Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser
						20					25					30
20		Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	His	Leu
						35					40					45
25		Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro
						50					55					60
30		Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser
						65					70					75
35		Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser
						80					85					90
40		Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly
						95					100					105
45		Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser
						110					115					120
50		Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala
						125					130					135
55		Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val
						140					145					150
60		Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu
						155					160					165
65		Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
						170					175					180
70		Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu
						185					190					195
75		Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	His	Cys	Ala
						200					205					210
80		Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val
						215					220					225
85		Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly
						230					235					240
90		Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val
						245					250					255
95		Glu	Val	Met	Leu	Lys										
						260										

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:6:

5		Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Gln	Thr	Phe	Gly	Glu	Arg	Lys
		1				5					10					15
15		Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser
						20					25					30
20		Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	His	Leu
						35					40					45
25		Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro
						50					55					60
30		Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser
						65					70					75
35		Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser
						80					85					90
40		Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly
						95					100					105
45		Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser
						110					115					120
50		Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala
						125					130					135
55		Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val
						140					145					150
60		Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu
						155					160					165
65		Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
						170					175					180
70		Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu
						185					190					195
75		Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	His	Cys	Ala
						200					205					210
80		Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val
						215					220					225
85		Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly
						230					235					240
90		Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val
						245					250					255
95		Glu	Val	Met	Leu	Lys										
						260										

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
 (B) TIPO: Aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:7:

	Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Gln	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Lys
	1				5					10					15
15	Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser
					20					25					30
	Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	Lys	Leu
20					35					40					45
	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro
					50					55					60
25	Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser
					65					70					75
	Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser
					80					85					90
30	Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly
					95					100					105
	Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser
35					110					115					120
	Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala
					125					130					135
40	Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val
					140					145					150
	Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu
45					155					160					165
	Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
					170					175					180
50	Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu
					185					190					195
	Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	His	Cys	Ala
					200					205					210
55	Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val
					215					220					225
	Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly
60					230					235					240
	Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val
					245					250					255
65	Glu	Val	Met	Leu	Lys										
					260										

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:8:

5		Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Gln	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Lys
		1			5					10						15
15		Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser
					20					25						30
20		Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	Arg	Leu
					35					40						45
25		Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro
					50					55						60
30		Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser
					65					70						75
35		Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser
					80					85						90
40		Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly
					95					100						105
45		Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser
					110					115						120
50		Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala
					125					130						135
55		Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val
					140					145						150
60		Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu
					155					160						165
65		Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
					170					175						180
70		Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu
					185					190						195
75		Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	His	Cys	Ala
					200					205						210
80		Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val
					215					220						225
85		Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly
					230					235						240
90		Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val
					245					250						255
95		Glu	Val	Met	Leu	Lys										
					260											

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
 (B) TIPO: Aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:9:

5		Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Gln	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Lys	
		1				5					10					15	
15		Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser	
						20					25					30	
20		Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	His	Leu	
						35					40					45	
25		Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	
						50					55					60	
30		Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Lys	Ser	
						65					70					75	
35		Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser	
						80					85					90	
40		Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly	
						95					100					105	
45		Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser	
						110					115					120	
50		Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala	
						125					130					135	
55		Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val	
						140					145					150	
60		Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu	
						155					160					165	
65		Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln	
						170					175					180	
70		Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu	
						185					190					195	
75		Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	His	Cys	Ala	
						200					205					210	
80		Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val	
						215					220					225	
85		Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly	
						230					235					240	
90		Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val	
						245					250					255	
95		Glu	Val	Met	Leu	Lys											
						260											

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:10:

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

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:11:

	Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Gln	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Lys
	1				5					10					15
15	Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser
					20					25					30
20	Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	His	Leu
					35					40					45
25	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro
					50					55					60
30	Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Asn	Lys
					65					70					75
35	Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser
					80					85					90
40	Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly
					95					100					105
45	Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser
					110					115					120
50	Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala
					125					130					135
55	Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val
					140					145					150
60	Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu
					155					160					165
65	Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
					170					175					180
70	Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu
					185					190					195
75	Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	His	Cys	Ala
					200					205					210
80	Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val
					215					220					225
85	Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly
					230					235					240
90	Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val
					245					250					255
95	Glu	Val	Met	Leu	Lys										
					260										

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
 (B) TIPO: Aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:12:

	Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Gln	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Lys	
	1				5					10					15	
15	Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser	
					20					25					30	
20	Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	His	Leu	
					35					40					45	
25	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	
					50					55					60	
30	Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	
					65					70					75	
35	Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser	
					80					85					90	
40	Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly	
					95					100					105	
45	Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser	
					110					115					120	
50	Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala	
					125					130					135	
55	Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val	
					140					145					150	
60	Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu	
					155					160					165	
65	Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln	
					170					175					180	
70	Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu	
					185					190					195	
75	Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Lys	Pro	Thr	His	Cys	Ala	
					200					205					210	
80	Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val	
					215					220					225	
85	Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly	
					230					235					240	
90	Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val	
					245					250					255	
95	Glu	Val	Met	Leu	Lys											
					260											

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:13:

	Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Gln	Thr	Phe	Gly	Glu	Thr	Lys
	1				5					10					15
15	Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser
					20					25					30
	Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	His	Leu
					35					40					45
20	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro
					50					55					60
	Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser
25					65					70					75
	Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser
					80					85					90
30	Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly
					95					100					105
	Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser
35					110					115					120
	Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala
					125					130					135
40	Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val
					140					145					150
	Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu
45					155					160					165
	Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
					170					175					180
50	Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu
					185					190					195
	Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Arg	Pro	Thr	His	Cys	Ala
55					200					205					210
	Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val
					215					220					225
60	Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly
					230					235					240
	Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val
					245					250					255
65	Glu	Val	Met	Leu	Lys										
					260										

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
 (B) TIPO: Aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:14:

	Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Gln	Thr	Phe	Gly	Arg	Thr	Lys	
	1				5					10					15	
15	Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser	
					20					25					30	
20	Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	His	Leu	
					35					40					45	
25	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	
					50					55					60	
30	Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Lys	Ser	
					65					70					75	
35	Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser	
					80					85					90	
40	Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly	
					95					100					105	
45	Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser	
					110					115					120	
50	Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala	
					125					130					135	
55	Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val	
					140					145					150	
60	Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu	
					155					160					165	
65	Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln	
					170					175					180	
70	Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu	
					185					190					195	
75	Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	His	Cys	Ala	
					200					205					210	
80	Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val	
					215					220					225	
85	Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly	
					230					235					240	
90	Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val	
					245					250					255	
95	Glu	Val	Met	Leu	Lys											
					260											

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
 (B) TIPO: Aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:15:

	Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Arg	Thr	Phe	Gly	Arg	Thr	Lys
	1				5					10					15
15	Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser
					20					25					30
20	Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	His	Leu
					35					40					45
25	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro
					50					55					60
30	Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Lys	Ser
					65					70					75
35	Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser
					80					85					90
40	Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly
					95					100					105
45	Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser
					110					115					120
50	Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala
					125					130					135
55	Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val
					140					145					150
60	Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu
					155					160					165
65	Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
					170					175					180
70	Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu
					185					190					195
75	Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Thr	Pro	Thr	His	Cys	Ala
					200					205					210
80	Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val
					215					220					225
85	Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly
					230					235					240
90	Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val
					245					250					255
95	Glu	Val	Met	Leu	Lys										
					260										

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
 (B) TIPO: Aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: Lineal

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:16:

	Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Gln	Thr	Phe	Gly	Arg	Thr	Lys
	1				5					10					15
15	Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser
					20					25					30
20	Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	His	Leu
					35					40					45
25	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro
					50					55					60
30	Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Lys	Ser
					65					70					75
35	Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser
					80					85					90
40	Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly
					95					100					105
45	Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser
					110					115					120
50	Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala
					125					130					135
55	Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val
					140					145					150
60	Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu
					155					160					165
65	Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
					170					175					180
70	Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu
					185					190					195
75	Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Lys	Pro	Thr	His	Cys	Ala
					200					205					210
80	Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val
					215					220					225
85	Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly
					230					235					240
90	Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val
					245					250					255
95	Glu	Val	Met	Leu	Lys										
					260										

ES 2 301 180 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°:17:

		Leu	Lys	Ile	Ala	Ala	Phe	Asn	Ile	Arg	Thr	Phe	Gly	Arg	Thr	Lys
		1				5					10					15
15		Met	Ser	Asn	Ala	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Ser
						20					25					30
20		Arg	Tyr	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	His	Leu
						35					40					45
25		Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro
						50					55					60
30		Asp	Thr	Tyr	His	Tyr	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Gly	Arg	Lys	Ser
						65					70					75
35		Tyr	Lys	Glu	Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Pro	Asp	Gln	Val	Ser
						80					85					90
40		Ala	Val	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro	Cys	Gly
						95					100					105
45		Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	Val	Arg	Phe	Phe	Ser
						110					115					120
50		Arg	Phe	Thr	Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	His	Ala
						125					130					135
55		Ala	Pro	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val
						140					145					150
60		Tyr	Leu	Asp	Val	Gln	Glu	Lys	Trp	Gly	Leu	Glu	Asp	Val	Met	Leu
						155					160					165
65		Met	Gly	Asp	Phe	Asn	Ala	Gly	Cys	Ser	Tyr	Val	Arg	Pro	Ser	Gln
						170					175					180
70		Trp	Ser	Ser	Ile	Arg	Leu	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Trp	Leu
						185					190					195
75		Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Ala	Lys	Pro	Thr	His	Cys	Ala
						200					205					210
80		Tyr	Asp	Arg	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	Ala	Val
						215					220					225
85		Val	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly
						230					235					240
90		Leu	Ser	Asp	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Ile	Ser	Asp	His	Tyr	Pro	Val
						245					250					255
95		Glu	Val	Met	Leu	Lys										
						260										