

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 610**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

A61K 38/51 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2007 E 07853916 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 2079835**

54 Título: **Composiciones y métodos de uso de mutantes de condroitinasa ABCI**

30 Prioridad:

10.10.2006 US 828800 P

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

07.07.2014

73 Titular/es:

**ACORDA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
420 Saw Mill River Road
Ardsley, NY 10502, US**

72 Inventor/es:

**CAGGIANO, ANTHONY, O.;
VECCHIONE, ANDREA y
IACI, JENNIFER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 473 610 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

Composiciones y métodos de uso de mutantes de condroitinasa ABCI

F. Fundamentos

5 La médula espinal está formada por fibras nerviosas. Un daño al sistema nervioso central, incluyendo la médula espinal, tiene como resultado una pérdida de la función. Los tipos más comunes de lesiones de la médula espinal (SCI: Spinal Cord Injuries) incluyen contusiones (hematomas de la médula espinal) y lesiones por compresión (provocadas por una presión prolongada sobre la médula espinal). Después de una lesión de la médula espinal en un mamífero adulto, la incapacidad de los axones para regenerarse puede dar lugar a pérdida de la sensibilidad, pérdida de la función motriz y/o pérdida de la función autonómica o neurovegetativa, así como una parálisis permanente. Una de las razones por las que las neuronas no se regeneran es su incapacidad para atravesar la cicatriz glial que se desarrolla después de una lesión de la médula espinal. El daño inducido por la lesión desarrollará cicatrización glial, que contiene moléculas de la matriz extracelular que incluyen proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPGs). Los CSPGs inhiben el crecimiento del tejido nervioso *in vitro* y la regeneración de tejido nervioso en regiones ricas en CSPGs *in vivo*. Los CSPGs están implicados en otras diversas condiciones incluyendo, p. ej., la inflamación.

Los documentos WO 2005/087920 y WO 2004/103299 describen cada uno de ellos la secuencia de aminoácidos de la condroitinasa ABCI de tipo silvestre y su uso para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central.

G. Sumario de la invención

20 Una realización de la presente invención proporciona una enzima condroitinasa ABCI mutante elegida entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6.

25 En realizaciones preferidas, tales enzimas mutantes condroitinasa ABCI muestran una actividad potenciada. En otras realizaciones preferidas, tales enzimas mutantes condroitinasa ABCI muestran una resistencia a la inactivación mejorada, incluyendo la inactivación por exposición a UV o al calor. La enzima mutante condroitinasa ABCI de la invención se selecciona a partir de 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°:2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6).

La secuencia de nucleótidos de condroitinasa ABCI de tipo silvestre de *Proteus vulgaris* se expone como SEC ID N°: 7 y la secuencia de aminoácidos de condroitinasa ABCI se expone como SEC ID N°: 8.

30 La invención incluye ácidos nucleicos que codifican las enzimas mutantes condroitinasa ABCI de la invención y métodos para su uso. En una forma de realización, la invención incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima mutante condroitinasa ABCI elegida entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 079D2-2 (SEC ID N°: 3), 057G1-1 (SEC ID N°: 4), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6). Se elige una secuencia de ácidos nucleicos de la invención a partir de ácidos nucleicos de 055D2-3 (SEC ID N°: 9), ácidos nucleicos de 079B6-2 (SEC ID N°: 10), ácidos nucleicos de 023G6-4 (SEC ID N°: 13) y ácidos nucleicos de 005B12-3 (SEC ID N°: 14).

35 Otras realizaciones de la presente invención se refieren al uso de una enzima de la invención para el tratamiento de un paciente en necesidad de recuperación neurológica funcional, incluyendo la función sensorial, motriz y autonómica o neurovegetativa, después de, p. ej., una lesión o enfermedad del sistema nervioso central ("SNC"). Las enzimas mutantes ABCI de la invención también pueden ser utilizadas para degradar CSPGs. En consecuencia, una realización de la invención incluye el uso de una enzima de la invención para la degradación de uno o más CSPGs usando una composición que comprende una enzima mutante ABCI de la invención. Una composición de la invención eficaz para promover la recuperación funcional neurológica comprende una enzima mutante condroitinasa ABCI elegida entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6).

45 Se contempla el uso de una enzima de la invención para modificar el acceso de las células a los espacios y regiones extravasculares, que comprende administrar a un paciente una composición que comprende una enzima de la invención. En consecuencia, la presente invención se refiere al uso de una enzima de la invención para facilitar la difusión de un agente en el sistema nervioso central o para potenciar la absorción de un agente en el sistema nervioso central. Se contempla el uso de una enzima de la invención para reducir la penetración de las células asociadas con la inflamación en el tejido de un paciente. La enzima se elige entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6).

55 Otra realización de la presente invención es el uso de una enzima de la invención para inhibir la extravasación de células asociadas con la inflamación de los vasos sanguíneos, en donde es administrada a un paciente una composición que comprende una enzima que segmenta proteoglicanos de sulfato de condroitina. En una realización, una enzima de la invención evita que las células elegidas entre el grupo que consiste en glóbulos blancos, leucocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, células B, células T, monocitos y macrófagos, salgan de la

corriente sanguínea. La enzima se elige entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023C6-4 (SEC ID N°: 5), y 005B12 - 3 (SEC ID N°: 6).

5 Otra realización de la invención es el uso de una enzima de la invención para tratar la inflamación en un paciente, en donde una enzima que segmenta proteoglicanos de sulfato de condroitina es administrada al paciente. La enzima se elige entre 055D2-3 (SEC ID NO: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6). En diversas realizaciones de la presente invención, la inflamación está asociada con una enfermedad o lesión, tales como la enfermedad inflamatoria crónica y la enfermedad del sistema nervioso central.

10 Otra realización de la invención es el uso de una enzima de la invención para prevenir la inflamación en un paciente, en donde una composición que comprende una enzima que segmenta proteoglicanos de sulfato de condroitina es administrada al paciente. La enzima se elige entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6).

15 Otra realización de la presente invención es el uso de una enzima de la invención para tratar la inflamación en un paciente, en donde células asociadas con la inflamación extraídas de un paciente son sometidas a una enzima que segmenta proteoglicanos de sulfato de condroitina *ex vivo* para modificar las células. La enzima se elige entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6).

20 En una realización, se usa una enzima de la presente invención para tratar a un paciente en necesidad de regeneración de tejido neurológico dañado. En otra realización, se usa una enzima de la invención para facilitar la difusión y el transporte de moléculas terapéuticas capaces de bloquear y/o superar la actividad de las moléculas inhibitoras del crecimiento neuronal en el tejido dañado o enfermo. Las realizaciones de la presente invención incluyen composiciones que comprenden enzimas mutantes condroitinasa ABCI de la invención y métodos para su uso para facilitar el suministro y la difusión de agentes terapéuticos o agentes de diagnóstico, y agentes que favorecen la regeneración de los nervios y los axones, en células o tejidos. Preferiblemente una composición de la invención es eficaz en la regeneración de tejido neurológico dañado o para facilitar la difusión o el transporte. Una composición de la invención comprende una enzima mutante condroitinasa ABCI elegida entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 5B12-3 (SEC ID N°: 6).

30 Otras realizaciones se refieren a métodos para favorecer la exytensión o crecimiento neuronal y uso en el tratamiento de lesiones de la médula espinal y trastornos relacionados del SNC mediante la administración de tal enzima mutante condroitinasa ABCI. Una composición de la invención comprende una enzima mutante condroitinasa ABCI elegida entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6).

Descripción de los dibujos

En parte, otros aspectos, características, beneficios y ventajas de las realizaciones de la presente invención serán evidentes en relación con las siguientes descripción, reivindicaciones anexas y dibujos que se acompañan donde:

35 La Figura 1 muestra los niveles relativos de proteína condroitinasa mutante en lisados de células enteras, como se describe con más detalle más adelante en el Ejemplo 3.

La Figura 2 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad de lisados de células enteras condroitinasa ABCI mutante a 37 °C, como se describe con más detalle en el Ejemplo 3.

La Figura 3 muestra los resultados de un ensayo de estabilidad de enzimas condroitinasa ABCI mutantes semi-purificadas, como se describe con detalle en el Ejemplo 4.

40 I. Descripción detallada

Antes de describir las presentes composiciones y métodos, se ha de entender que esta invención no está limitada a las moléculas, composiciones, metodologías o protocolos descritos en particular, por cuanto estos pueden variar. También se ha de entender que la terminología usada en la descripción tiene la finalidad de describir solamente versiones o realizaciones particulares, y no se pretende limitar el alcance de la presente invención que se limitará tan sólo por las reivindicaciones adjuntas.

45 También hay que señalar que, como se usa en el presente texto y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique lo contrario con claridad. Así, p. ej., la referencia a "una célula" es una referencia a una o más células y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente texto tienen los mismos significados como se entienden comúnmente por un profesional con experiencia normal en la técnica. Aunque en la práctica o ensayo de formas de realización de la presente invención se puede utilizar cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente texto, se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos. Nada en el presente texto se ha de considerar como admisión de que la invención no está capacitada para anteceder tal descripción en virtud de una invención anterior.

Como se usa en el presente texto, el término "aproximadamente" significa más o menos el 10 % del valor numérico del número con el que se emplea. Por tanto, significa aproximadamente el 50 % en el margen de 45 % a 55 %.

"Administrar", cuando se utiliza junto con una terapia, significa administrar una terapia directamente en o a un tejido diana o administrar una terapia a un paciente mediante la cual la terapia impacta positivamente en el tejido al que se dirige. Por lo tanto, como se usa en el presente texto, el término "administrar" puede incluir, pero sin limitarse a ello, proporcionar una enzima en o a un tejido diana; proporcionar una enzima sistémicamente a un paciente mediante, p. ej., inyección intravenosa por la cual el producto terapéutico alcanza el tejido diana; proporcionar una enzima en forma de la secuencia que la codifica al tejido diana (p. ej. mediante las llamadas técnicas de terapia génica).

El término "animal" como se usa en el presente texto incluye, pero sin limitarse a ellos, los seres humanos y los vertebrados no humanos, tales como animales silvestres, domésticos y de granja.

El término "mejora" se utiliza para expresar que la presente invención cambia bien sea la apariencia, o la forma, las características y/o los atributos físicos del objetivo al que ha sido proporcionada, aplicada o administrada. El cambio puede ser demostrado por cualquiera de los siguientes aspectos solos o en combinación, incluyendo la degradación de los CSPGs de la zona lesionada de la médula espinal o en el SNC o la restauración, en su totalidad o en parte, de la función motriz, sensorial o autonómica del mamífero.

El término "inhibir" incluye administrar un compuesto de la presente invención para prevenir la aparición de los síntomas, aliviar los síntomas, o eliminar la enfermedad, la condición o el trastorno.

Por la expresión "farmacéuticamente aceptable", se entiende que el vehículo, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de los mismos.

La expresión "proteína recombinante" se refiere a un polipéptido de la presente invención que se produce por técnicas de ADN recombinante, en donde generalmente el ADN que codifica un polipéptido se inserta en un vector de expresión adecuado que es a su vez usado para transformar una célula hospedadora para producir la proteína. Además, se pretende que la frase "derivado de" con respecto a un gen recombinante incluya dentro del significado de "proteína recombinante" las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos de una proteína nativa, o una secuencia de aminoácidos similar a la misma que se genera mediante mutaciones incluyendo sustituciones y deleciones o borrados (incluyendo el truncamiento) de una forma natural de la proteína.

Como se usa en el presente texto, el término "terapéutico" significa un agente utilizado para tratar, combatir, mejorar o prevenir una condición o la enfermedad no deseada de un paciente. En parte, las realizaciones de la presente invención están dirigidas al tratamiento del sistema nervioso central, tal como la degradación de los CSPGs de un área lesionada de la médula espinal o en el SNC, o la restauración, en su totalidad o en parte, de una función motriz, sensorial o autonómica del mamífero. Otras realizaciones de la invención se dirigen a la inhibición de la extravasación de células. Sin embargo, otras realizaciones de la invención se dirigen a mejorar o facilitar la difusión, como se discute en el presente texto. Otras realizaciones se dirigen a tratar o prevenir la inflamación.

Las expresiones "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva", como se usa en el presente texto, se pueden usar indistintamente y se refieren a una cantidad de un componente de compuesto terapéutico de la presente invención. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico es una cantidad predeterminada calculada para conseguir el efecto deseado, es decir, para tratar con eficacia una lesión en el sistema nervioso central. Por ejemplo, un compuesto terapéutico que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una condroitinasa formulada para proporcionar una enzima activa estable, es suficiente para degradar los CSPGs de un área lesionada de la médula espinal o una cantidad suficiente para restablecer, en su totalidad o en parte, de una función motriz, sensorial o autonómica del mamífero y puede tener como resultado una regeneración de neuronas en el sistema nervioso central, tal como promoviendo la extensión axonal en un área lesionada. Una cantidad terapéuticamente efectiva incluye también una cantidad eficaz para degradar CSPGs y de esa forma promover la recuperación de la función neurológica. Una cantidad terapéuticamente efectiva incluye también una cantidad suficiente para modificar la extravasación de las células o para reducir o prevenir la inflamación.

Los términos "tratar", "tratado" o "tratamiento" como se usan en el presente texto, se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o retardar (reducir) una condición fisiológica, trastorno o enfermedad no deseados, u obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitarse a ellos, el alivio de los síntomas; la disminución de la extensión de la condición, trastorno o enfermedad; la estabilización (es decir, ausencia de empeoramiento) del estado de la condición, trastorno o enfermedad; el retraso en el inicio o retardamiento de la progresión de la condición, trastorno o enfermedad; el mejoramiento de la condición, trastorno o estado de la enfermedad; y la remisión (ya sea parcial o total), bien sea detectable o indetectable, o la potenciación o mejora de la condición, el trastorno o la enfermedad. El tratamiento incluye la obtención de una respuesta clínicamente significativa sin excesivos niveles de efectos secundarios. El tratamiento también incluye la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

El proceso de "extravasación" es conocido como la transmigración de células, tales como leucocitos, de un vaso sanguíneo al espacio extravascular, y puede incluir además la migración al tejido circundante. Como se usa en el

presente texto, el término "leucocito" se utiliza para referirse a la clase de células asociadas con la inflamación, que también se puede definir como cualquiera de las diversas células sanguíneas que tienen un núcleo y citoplasma. También conocidos como glóbulos blancos, los leucocitos incluyen los neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, tales como células B, células T, monocitos y macrófagos. Cuatro tipos de leucocitos son particularmente importantes en la defensa inmunitaria, incluyendo los neutrófilos, que liberan varias proteínas antibacterianas; los monocitos, que son los precursores de macrófagos que engullen y destruyen las partículas extrañas, y los linfocitos T y B, que son las células de reconocimiento de antígeno de las células inmunitarias.

El término "vector" se refiere a un vehículo que puede transportar las moléculas de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido condroitinasa se unen covalentemente al ácido nucleico del vector. Con este aspecto de la invención, el vector puede ser, p. ej., un plásmido, un fago de cadena simple o doble, un vector viral de ADN o ARN de cadena simple o doble, o un cromosoma artificial, tal como un BAC, PAC, YAC, O MAC.

Una realización de la presente invención proporciona mutantes de condroitinasa ABCI. En una realización preferida, las enzimas mutantes condroitinasa ABCI y los ácidos nucleicos que las codifican son las de los clones aislados seleccionados entre 055D2-3 (depositados en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110 - 2209 el 26 de septiembre 2007 y que tiene una designación de depósito ATCC PTA-86661) (SEC ID NO: 1 y SEC ID N ° 9), 079B6-2 (depositado en la ATCC el 26 de septiembre de 2007 y que tiene la designación de depósito ATCC PTA-8662) (SEC ID N °: 2 y SEC ID NO: 10), 023G6-4 (depositado en la ATCC el 26 de septiembre de 2007 y que tiene la designación de depósito ATCC PTA-8659) (SEC ID N °: 5 y SEC ID NO: 13) y 005B12-3 (depositado en la ATCC el 26 de septiembre de 2007 y que tiene la designación de depósito ATCC PTA-8660) (SEC ID N °: 6 y SEC ID NO: 14). La secuencia de nucleótidos de condroitinasa ABCI se expone como SEC ID N ° 7 y la secuencia de aminoácidos de condroitinasa ABCI se expone como SEC ID N ° 8.

Los depósitos ATCC mencionados en el presente texto se mantendrán bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a efectos de procedimientos de patente. Estos depósitos se proporcionan simplemente como conveniencia para los expertos en la técnica. Puede requerirse una licencia para hacer, usar o vender los materiales depositados, y en el presente no se otorga tal licencia.

Una realización de la presente invención proporciona mutantes de condroitinasa ABCI. En realizaciones preferidas, tales enzimas mutantes de condroitinasa ABCI muestran una mayor actividad. En una realización, una enzima de la invención tiene un nivel de actividad enzimática (medido por su capacidad para degradar un sustrato de CSPG) que es de hasta aproximadamente dos veces mayor que el nivel de actividad de la correspondiente enzima de tipo silvestre. En otra realización, una enzima de la invención tiene un nivel de actividad enzimática que es de hasta aproximadamente tres veces mayor que la actividad de la correspondiente condroitinasa de tipo silvestre. Las enzimas mutantes de condroitinasa ABCI se eligen entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6). Más preferiblemente, la enzima se elige entre el grupo que consiste de 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), y 023G6-4 (SEC ID N°: 5).

La invención incluye ácidos nucleicos que codifican las enzimas mutantes de condroitinasa ABCI de la invención que tienen una actividad potenciada, y métodos para su uso. La invención incluye secuencias de ácidos nucleicos que codifican las enzimas mutantes de condroitinasa ABCI elegidas entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12- (SEC ID N°: 6). Preferiblemente, se elige una secuencia de ácidos nucleicos de la invención entre ácido nucleico 055D2-3 (SEC ID N°: 9), ácido nucleico 079B6-2 (SEC ID N°: 10), ácido nucleico 023G6-4 (SEC ID N°: 13) y ácido nucleico 005B12-3 (SEC ID N°: 4).

En otras realizaciones preferidas, tales enzimas mutantes de condroitinasa ABCI presentan una mejor resistencia a la inactivación. En una realización, una mejor resistencia a la inactivación permite que una enzima de la invención permanezca activa después de un estrés (tal como calor o UV) durante un tiempo que es hasta aproximadamente diez veces más prolongado que para la correspondiente condroitinasa de tipo silvestre. Por ejemplo, si una condroitinasa de tipo silvestre mantiene una actividad medible durante hasta aproximadamente 3 días, una enzima condroitinasa de la invención mantiene una actividad medible durante unos 30 días bajo las mismas condiciones. Las enzimas mutantes condroitinasa ABCI que tienen una mayor resistencia a la inactivación se eligen entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5), y 005B12-3 (SEC ID N°: 6). Más preferiblemente, se elige la enzima entre el grupo que consiste en 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2) y 023G6-4 (SEC ID N°: 5).

La invención incluye ácidos nucleicos que codifican las enzimas mutantes condroitinasa ABCI de la invención que tienen una resistencia mayor a la inactivación, y métodos para su uso. La invención incluye secuencias de ácidos nucleicos que codifican las enzimas mutantes condroitinasa ABCI seleccionadas entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6). Preferiblemente, se elige una secuencia de ácidos nucleicos de la invención entre ácido nucleico 055D2 - 3 (SEC ID N°: 9), ácido nucleico 079B6 - 2 (SEC ID N°: 10), ácido nucleico 023G6-4 (SEC ID N°: 13) y ácido nucleico 005B12-3 (SEC ID N°: 14).

En otra realización más, se proporciona una enzima mutante de la condroitinasa ABCI que tiene una estabilidad incrementada. La enzima muestra mayor resistencia a la inactivación bajo condiciones de estrés, incluyendo la exposición a la luz UV o al calor, en comparación con la de la enzima ABCI de tipo silvestre. En una realización

preferida, la enzima muestra mayor estabilidad en comparación con la enzima condroitinasa ABCI de tipo silvestre después de un estímulo de estrés. Las enzimas mutantes ABCI condroitinasa que tienen mayor estabilidad se eligen entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6). Más preferiblemente, la enzima se elige entre el grupo que consiste en 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), y 023G6-4 (SEC ID N°: 5).

Las enzimas de la invención pueden ser usadas para prevenir, tratar y aliviar los síntomas de inflamación y los estados inflamatorios. En una realización, se usa una enzima mutante condroitinasa ABCI de la invención para prevenir, tratar o aliviar los síntomas de enfermedades inflamatorias crónicas. Una enzima mutante condroitinasa ABCI de la invención puede ser utilizada para tratar la inflamación asociada con dolor, inyección y estados patológicos. Una enzima de la invención puede ser usada para prevenir el daño en tejidos que está asociado con procesos inflamatorios. Varias condiciones, incluyendo enfermedades inflamatorias crónicas, pueden beneficiarse de la respuesta inmunitaria controlada. Algunos ejemplos de enfermedades inflamatorias crónicas incluyen el asma, la artritis reumatoide (RA), la esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico (LES), y la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). También se puede usar una enzima de la invención para regular el estado inflamatorio asociado con una o más enfermedades seleccionadas entre el grupo que consiste en trastornos del sistema nervioso central, enfermedades del sistema nervioso central, lesión de la médula espinal, y enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades inflamatorias, las enfermedades autoinmunitarias, y las enfermedades con un componente inflamatorio que pueden ser tratadas con una composición que comprende una enzima de la invención, incluyen también la esclerosis múltiple, meningitis, encefalitis, artritis reumatoide, osteoartritis, lupus, granulomatosis de Wegener, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis de Crohn, colitis ulcerosa, asma, infecciones por clamidia, sífilis, tiroiditis, arteritis temporal, polimialgia reumática, espondilitis anquilosante, psoriasis, vasculitiditis tales como arteritis temporal, arteritis de Takayasu, aortitis sífilítica, aneurismas infecciosos, aneurismas ateroscleróticos, aneurismas aórticos abdominales inflamatorios, poliarteritis nodosa, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Churg-Strauss, vasculitis por hipersensibilidad, enfermedad de Buerger, enfermedad veno-oclusiva inflamatoria mesentérica, flebitis, tromboflebitis, Churg-Strauss, angitis primaria del SNC, vasculitis inducida por fármacos, cualquier arteritis o venulitis secundaria, gota, seudogota, sarcoidosis, síndrome de Sjogren, mielitis, salpingitis de cualquier etiología, uveítis, enfermedad inflamatoria pélvica, glomerulonefritis de cualquier etiología, síndrome de Goodpasture, pericarditis, miocarditis, endocarditis, y pancreatitis.

Las enzimas de la presente invención pueden utilizarse para modificar el acceso de las células a los espacios y regiones extravasculares, administrando a un paciente una composición que comprende una enzima mutante condroitinasa ABCI de la invención. Las enzimas de la presente invención pueden usarse también para reducir la penetración de las células asociada con la inflamación en el tejido de un paciente, administrando a un paciente una composición que comprende una enzima de la invención.

Las enzimas de la presente invención pueden usarse para inhibir la extravasación de las células asociada con la inflamación desde los vasos sanguíneos administrando a un paciente una composición que comprende una enzima mutante condroitinasa ABCI de la invención. La enzima de la invención puede prevenir la extravasación de las células seleccionadas entre el grupo elegido entre el grupo que consiste en glóbulos blancos, leucocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, células B, células T, monocitos, macrófagos y células, evitando que salgan de la corriente sanguínea.

Las enzimas de la presente invención pueden usarse también para el tratamiento de la inflamación en un paciente, sometiendo las células extraídas de un paciente a una enzima mutante condroitinasa ABCI de la invención *ex vivo* para modificar las células. Las células sanguíneas modificadas pueden ser posteriormente readministradas al paciente. Por consiguiente, el uso de las enzimas descritas en el presente texto también puede ser dirigido a tratamientos *ex vivo*.

La extracción de células puede realizarse por diversos métodos que incluyen, pero sin limitarse a ellos, la extracción de sangre intravenosa, transfusión, diálisis, bypass, trasplante de órgano y otros métodos similares que tienen por resultado la retirada de células del cuerpo. La administración de las células puede llevarse a cabo por los mismos métodos utilizados para extraer las células, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, la administración intravenosa, transfusión, diálisis, bypass, trasplante de órgano y similares.

Un leucocito circulante con ligandos expresados en su superficie que contienen cadenas de carbohidratos puede ser extraído de un paciente y modificado *ex vivo* mediante una o más de las enzimas mutantes ABCI de la invención. La extracción puede llevarse a cabo mediante extracción de sangre, transfusión, diálisis, bypass o trasplante de órgano. Como se ha descrito, una enzima mutante condroitinasa ABCI de la invención modifica las cadenas de carbohidratos. Una vez modificados, los leucocitos pueden ser reintroducidos en el torrente sanguíneo de un paciente. Los leucocitos modificados serán incapaces de adherirse a selectinas, mucinas e integrinas expresadas en el endotelio. La programación en el tiempo de una extracción y reintroducción en el torrente sanguíneo puede ser optimizada observando la respuesta inflamatoria y la aparición de leucocitos en el torrente sanguíneo, una vez que dichas células son señaladas a sitios específicos de lesión o infección. Como resultado, puede ser regulada, prevenida, reducida o controlada la extravasación de leucocitos a los tejidos. Tal regulación se puede utilizar en los

métodos y tratamientos dirigidos al control y tratamiento de la respuesta inflamatoria y enfermedades con un componente inflamatorio.

Las composiciones de la presente invención pueden ser utilizadas para el tratamiento de lesiones de la médula espinal y en la promoción de la regeneración de los axones. Las composiciones de la presente invención pueden ser utilizadas también para promover la plasticidad, el recrecimiento, la reparación y/o la regeneración de neuronas disfuncionales en el SNC que han sido dañadas como resultado de una enfermedad, tal como enfermedades degenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Ventajosamente, el uso de polipéptidos que degradan proteoglicano o polipéptidos de transducción de la membrana en las composiciones de la presente invención también favorecen la difusión y el acceso de tejido dañado o enfermo a otros agentes terapéuticos que promueven la regeneración de las neuronas.

Una realización más de la presente invención es una composición que comprende una enzima mutante condroitinasa ABCI para tratar lesiones del sistema nervioso central. En realizaciones preferidas, la enzima mutante condroitinasa ABCI se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva. La enzima mutante condroitinasa ABCI utilizada para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central se elige entre el grupo que consiste en 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6). Más preferiblemente, la enzima se elige entre el grupo que consiste en 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), y 023G6-4 (SEC ID N°: 5). Tales lesiones del sistema nervioso central pueden incluir, pero sin limitarse a ellas, lesiones de la médula espinal, incluyendo lesiones inducidas por traumatismo, contusiones, o lesiones de compresión.

Otra realización de la presente invención es una composición que comprende una enzima mutante condroitinasa ABCI para favorecer la extensión neuronal. En realizaciones preferidas, la enzima mutante condroitinasa ABCI se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva. La enzima mutante condroitinasa ABCI que promueve la extensión neuronal se elige entre el grupo que consiste en 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6). Más preferiblemente, la enzima se elige entre el grupo que consiste en 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), y 023G6-4 (SEC ID N°: 5).

Otras realizaciones de la presente invención se refieren al uso de una enzima de la invención para promover la recuperación funcional neurológica después de una lesión o enfermedad del sistema nervioso central ("SNC"). En realizaciones preferidas, la enzima mutante condroitinasa ABCI se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva. En particular, la presente invención está dirigida a utilizar la condroitinasa para promover la recuperación funcional neurológica sensorial, motriz o autonómica después de una lesión en la médula espinal. Las composiciones útiles en este método incluyen formulaciones aceptables de una enzima mutante condroitinasa ABCI de la invención, incluyendo, p. ej., formulaciones de la enzima de liberación inmediata y liberación sostenida. La presente invención también está dirigida al uso para una enzima de la invención para promover la recuperación funcional neurológica después de una lesión por contusión de la médula espinal. Los tipos más comunes de lesiones de la médula espinal (SCI) incluyen contusiones (hematomas de la médula espinal) y lesiones por compresión (causadas por presión sobre la médula espinal). En las lesiones por contusión, el tipo más común de lesión, se forma a menudo una cavidad o un orificio en el centro de la médula espinal. Las enzimas mutantes ABCI de la invención pueden también usarse para degradar CSPGs. En consecuencia, una realización de la invención incluye el uso de una enzima de la invención para degradar una o más CSPGs usando una composición que comprende una enzima mutante ABCI de la invención. Una composición de la invención eficaz para promover la recuperación funcional neurológica comprende una enzima mutante condroitinasa ABCI elegida entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6).

Una realización de la presente invención es una composición y su uso que facilita el acceso y la distribución en las células de un agente terapéutico y de diagnóstico en la composición, a través de membranas o en los tejidos mediante el uso de la composición que incluye al menos una enzima capaz de segmentar los proteoglicanos. La composición comprende una enzima mutante condroitinasa ABCI elegida entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6). Las moléculas o agentes en la composición pueden incluir uno o más factores de crecimiento, incluyendo, p. ej., factor neurotrófico derivado del cerebro, factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento de fibroblastos, factor neurotrófico ciliar, factor neurotrófico derivado del glial, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento glial 2, L1, GM1, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento nervioso, e inmunofilinas. La composición en algunas realizaciones comprende un agente fluorescente o de contraste para formación de imágenes. De acuerdo con una realización, el agente incluye una célula para trasplante, por ejemplo una célula madre o neurona, una célula como agente de suministro, un agente quimioterapéutico, un antibiótico, un anticuerpo, o un antagonista del receptor de Nogo. Las composiciones pueden usarse para el tratamiento de una lesión del SNC. Preferiblemente, la composición se usa en el tratamiento de daño neuronal a partir de una lesión por contusión.

Los tratamientos descritos en el presente texto suministran una cantidad de una enzima mutante condroitinasa ABCI efectiva para degradar CSPGs y de esta manera promover, p. ej., la recuperación de la función neurológica, incluyendo opcionalmente un agente terapéutico, para el SNC. Tales métodos pueden incluir opcionalmente administrar, en combinación con una enzima mutante condroitinasa ABCI de la invención, otra condroitinasa, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, condroitinasa ABCI, condroitinasa ABCII, condroitinasa AC y condroitinasa B, o coadministrar una enzima de mamífero con actividad similar a la condroitinasa, tal como hialuronidasas Hyal1,

Hyal2, Hyal3, Hyal4 y PH20 preferiblemente al SNC, y más preferiblemente a las lesiones de la zona del SNC lesionada. Una vez que las proteínas o polipéptidos en las composiciones han sido purificados hasta el punto deseado, pueden ser suspendidos o diluidos en un vehículo fisiológico o excipiente apropiado para el tratamiento.

5 La condroitinasa se puede obtener de varias fuentes, incluyendo un microorganismo que exprese de forma natural una condroitinasa; por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, o a partir de la expresión de una proteína recombinante en una célula hospedadora. La célula hospedadora puede ser una célula procariótica (tal como *E. coli*) o una célula eucariótica (tal como una levadura, una célula de mamífero o una célula de insecto).

10 Los ácidos nucleicos de condroitinasa ABCI mutante de la presente invención se pueden obtener por varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la reacción en cadena de la polimerasa y/o otras técnicas para generar mutaciones en el *P. vulgaris* de tipo silvestre u otra secuencia de codificación de condroitinasa. En una realización, puede hacerse una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima mutante condroitinasa ABCI seleccionada entre 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6). Preferiblemente, se elige una secuencia de ácidos nucleicos de la invención, en donde el ácido nucleico se selecciona entre ácido nucleico 055D2-3 (SEC ID N°: 9), ácido nucleico 079B6-2 (SEC ID N°: 10), ácido nucleico 023G6-4 (SEC ID N°: 13) y ácido nucleico 005B12-3 (SEC ID N°: 14).

15 La expresión de una secuencia de ácidos nucleicos ABCI mutante recombinante de la invención puede realizarse ligando un ácido nucleico que codifica la proteína mutante ABCI, o una porción de la misma, en un vector adecuado para la expresión en células procariotas, o bien en células eucariotas, o ambas. Los procedimientos para la ligación son bien conocidos por los profesionales con una experiencia normal en la técnica. Los vectores de expresión para la producción de formas recombinantes de los polipéptidos condroitinasa sujetos incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados para la expresión de un polipéptido mutante condroitinasa ABCI incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

20 Existen varios vectores para la expresión de proteínas recombinantes en levadura y se podrían utilizar para expresar una proteína mutante ABCI recombinante de la invención. Por ejemplo, YEP24, YIP5, YEP51, YEP52, pYES2, y YRP17 son vehículos de clonación y de expresión útiles en la introducción de construcciones genéticas en *S. cerevisiae* (véase, p. ej., Broach et al. (1983) en *Experimental Manipulation of Gene Expression*, ed. M. Inouyc Academic Press, p.83).

25 En otra realización, se produce un polipéptido mutante condroitinasa ABCI de la invención de forma recombinante utilizando un vector de expresión generado por subclonación de la secuencia de codificación de una de las proteínas condroitinasa representadas en 055D2-3 (SEC ID N°: 1), 079B6-2 (SEC ID N°: 2), 023G6-4 (SEC ID N°: 5) y 005B12-3 (SEC ID N°: 6).

30 En algunos casos, puede ser deseable expresar un polipéptido mutante condroitinasa ABCI recombinante de la invención mediante el uso de un sistema de expresión en insectos tal como el sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1), y vectores derivados de pBlueBac (tales como la pBlueBac III que contiene β - gal).

35 Los vectores de expresión y las células hospedadoras enumeradas en el presente texto se proporcionan solamente a título de ejemplo y representan los sistemas bien conocidos disponibles para los expertos en la técnica, que pueden ser útiles para expresar las moléculas de ácido nucleico. El profesional con una experiencia normal en la técnica estará al tanto de otros sistemas adecuados para la propagación de mantenimiento o la expresión de las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente texto.

40 Las enzimas de la invención pueden ser formuladas en composiciones y formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones estables adecuadas y los métodos de purificación se exponen en la solicitud PCT n° US2005/017464 pendiente en común con la presente, presentada el 18 de mayo de 2005 y titulada "Methods of Purifying Chondroitinase and Stable Formulations Thereof" ("Métodos de purificación de condroitinasa y formulaciones estables de la misma").

45 Varias realizaciones proporcionan una formulación estable de una enzima mutante condroitinasa ABCI de la invención, tanto para el almacenamiento como para la administración. Generalmente, la enzima de tales formulaciones estables muestra al menos aproximadamente el 50 % de actividad aproximadamente a las 24 horas, preferiblemente al menos aproximadamente el 75 % de actividad, más preferiblemente al menos aproximadamente el 85 % de actividad. En otro aspecto de la invención, las formulaciones proporcionan de forma consistente una actividad estable de condroitinasa.

50 En una realización, la condroitinasa se formula en un tampón de fosfato, preferiblemente un tampón de fosfato sódico con una concentración en el intervalo de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 1 M. Una realización preferida es de fosfato sódico aproximadamente 750 mM. Otra realización preferida es fosfato sódico aproximadamente 100 mM. En otra realización, la condroitinasa se puede formular en un tampón de fosfato sódico

que comprende además acetato sódico. El acetato sódico puede estar presente en el intervalo de 25 mM a aproximadamente 75 mM. En una realización preferida, la concentración de acetato sódico es de aproximadamente 50 mM. En una realización, una formulación preferida para la administración es una condroitinasa en un tampón con un pH de aproximadamente 7,4. Otras realizaciones de formulaciones para el almacenamiento y la administración se proporcionan en los Ejemplos descritos.

En otras realizaciones, se proporciona una formulación que comprende una enzima mutante condroitinasa ABCI purificada de la invención y un tampón que comprende un aumento de fuerza iónica. Las realizaciones en las que una formulación comprende una concentración iónica aumentada pueden incrementar la estabilidad de una formulación de enzima. Por ejemplo, una realización preferida proporciona una formulación con NaCl aproximadamente 1 M en fosfato sódico. La concentración de fosfato sódico puede ser aproximadamente 50 mM. En una realización preferida, la concentración de almacenamiento de enzima es inferior a aproximadamente 0,4 mg/ml.

En una realización, una formulación de enzima mutante ABCI condroitinasa comprende aproximadamente 0,4 mg/ml de una enzima mutante condroitinasa ABCI de la invención en fosfato sódico aproximadamente 100 mM, a un pH de aproximadamente 7,4 con una especificidad de sustrato preferida para condroitina A, B y C aproximadamente la misma.

Diversas realizaciones proporcionan una formulación estable de una enzima mutante condroitinasa ABCI de la invención tanto para el almacenamiento como para la administración. Generalmente, la enzima de tales formulaciones estables muestra al menos aproximadamente 50 % de actividad a aproximadamente las 24 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 75 % de actividad, más preferiblemente al menos aproximadamente 85 % de actividad. En otro aspecto de la invención, las formulaciones proporcionan de forma consistente una actividad de condroitinasa estable.

En otra realización, se proporciona una purificación de la enzima mutante condroitinasa ABCI que comprende las etapas siguientes: 1) extracción de la enzima a partir de una célula, 2) separación del extracto celular crudo usando cromatografía de intercambio catiónico, 3) continuación de la separación del extracto mediante una cromatografía de filtración en gel, y 4) eliminación de endotoxina mediante una membrana de intercambio aniónico para producir una enzima mutante condroitinasa ABCI purificada de la invención. En una realización, se dializa una condroitinasa ABCI purificada de la invención en un tampón volátil, se liofiliza y se almacena a -80 °C.

La actividad de la condroitinasa puede estabilizarse mediante la adición de excipientes o mediante liofilización. Los estabilizantes incluyen carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y agentes tensoactivos y son conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen carbohidratos tales como sacarosa, lactosa, manitol y dextrano, proteínas tales como albúmina y protamina, aminoácidos tales como arginina, glicina, y treonina, agentes tensoactivos tales como TWEEN® y PLURONIC®, sales tales como cloruro de calcio y fosfato sódico, y lípidos tales como ácidos grasos, fosfolípidos y sales biliares.

Las enzimas mutantes condroitinasa ABCI de la invención se pueden administrar por vía tópica, local o sistémica. La administración tópica o local es preferible para un mayor control de la aplicación. Una enzima de la invención, particularmente o en combinación con otras enzimas de la invención o con otras enzimas degradadoras de CSPG, se puede mezclar con un vehículo farmacéutico apropiado antes de la administración. La administración incluye el suministro de la enzima al sitio de la lesión o el sitio en el que se encuentran los CSPGs que han de ser degradados. Ejemplos de vehículos y aditivos farmacéuticos utilizados generalmente son diluyentes convencionales, aglutinantes, lubricantes, agentes colorantes, agentes disgregantes, agentes tampón, ácidos grasos isotonzantes, agentes isotonzantes, agentes conservantes, anestésicos, agentes tensoactivos y similares, y son conocidos por los expertos en la técnica. Los vehículos farmacéuticos que se pueden usar incluyen dextrano, sacarosa, lactosa, maltosa, xilosa, trehalosa, manitol, xilitol, sorbitol, inositol, albúmina de suero, gelatina, creatinina, polietilenglicol, agentes tensoactivos no iónicos (por ejemplo, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, aceite de ricino endurecido con polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, polioxietileno polioxipropileno glicol) y compuestos similares.

Un régimen de tratamiento de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo por medio de la administración de una composición que comprende una enzima mutante condroitinasa ABCI de la presente invención. El régimen de tratamiento puede comprender además la administración de condroitinasa ABCI, condroitinasa ABCII, condroitinasa AC y condroitinasa B o enzimas de mamífero con actividad similar a la condroitinasa tales como las hialuronidasas Hyal1, Hyal2, Hyal3, Hyal4 y PH20 a las lesiones de la zona del SNC lesionada. El modo de administración, la programación en el tiempo de la administración y la dosificación se llevan a cabo de manera tal que la recuperación funcional del deterioro del sistema nervioso central se potencia por la promoción del crecimiento de las neuritas.

La cantidad efectiva de condroitinasa puede administrarse en una dosis simple, en dos dosis o en varias dosis. Aunque se ha de entender que la dosis se puede administrar en cualquier momento, en una realización se administra la dosis dentro de las 12 horas posteriores a la lesión, o lo antes posible. En otra realización, la dosis se administra a un mamífero lesionado en una, en dos o en varias dosis; tales dosis dependerían de la gravedad de la lesión y la cantidad de CSPGs presentes en la cicatrización glial. Cuando se administran varias dosis, pueden ser suministradas sobre una base diaria, semanal o quincenal. El suministro de las dosis puede ser mediante un catéter

o una jeringa. Alternativamente, el tratamiento se puede administrar durante la cirugía para permitir la aplicación directa a la cicatriz glial.

5 Por ejemplo, en algunos aspectos, la invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un compuesto, como se define anteriormente, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, o una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define anteriormente.

10 Los compuestos de la presente invención se pueden administrar de la manera convencional por cualquier vía en la que sean activos. La administración puede ser sistémica, tópica, u oral. Por ejemplo, la administración puede ser, pero sin limitarse a ellas, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, oral, bucal, u ocular, o por vía intravaginal, por inhalación, por inyecciones de depósito, o por implantes. Así pues, los modos de administración para los compuestos de la presente invención (ya sean solos o en combinación con otros productos farmacéuticos) pueden ser, pero sin limitarse a ellos, sublingual, inyectable (incluyendo formas de acción corta, depósito, implantes y píldoras inyectados por vía subcutánea o intramuscular), o mediante el uso de cremas vaginales, supositorios, óvulos vaginales, anillos vaginales, supositorios rectales, dispositivos intrauterinos y formas transdérmicas, tales como parches y cremas.

15 Los modos específicos de administración dependerán de la indicación. La selección de la vía de administración específica y el régimen de dosis ha de ser ajustada o valorada por el médico de acuerdo con métodos conocidos por el clínico con el fin de obtener la respuesta clínica óptima. La cantidad de compuesto a administrar es aquella cantidad que sea terapéuticamente efectiva. La dosis a administrar dependerá de las características del sujeto que se está tratando, p. ej., el animal tratado en particular, la edad, el peso, la salud, los tipos de tratamiento
20 concurrente, si hay alguno, y la frecuencia de los tratamientos, y puede ser determinada fácilmente por un profesional experto en la técnica (por ejemplo, por el médico).

25 Las formulaciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la presente invención y un vehículo adecuado pueden ser formas de dosificación sólidas que incluyen, pero sin limitarse a ellas, comprimidos, cápsulas, sellos, pastillas, píldoras, polvos y gránulos; formas de dosificación tópica, que incluyen, pero sin limitarse a ellas, soluciones, polvos, emulsiones fluidas, suspensiones fluidas, semisólidos, pomadas, pastas, cremas, geles y jaleas, y espumas; y formas de dosificación parenteral que incluyen, pero sin limitarse a ellas, soluciones, suspensiones, emulsiones, y polvo seco; que comprende una cantidad efectiva de un polímero o copolímero de la presente invención. También es sabido en la técnica que los ingredientes activos pueden estar contenidos en tales formulaciones con diluyentes farmacéuticamente aceptables, cargas, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, agentes tensoactivos, vehículos hidrófobos, vehículos solubles en agua, emulsionantes, tampones, humectantes, hidratantes, solubilizantes, conservantes y similares. Los medios y métodos para la administración son conocidos en la técnica y un experto puede consultar diversas referencias farmacológicas para su orientación. Por ejemplo, puede consultarse *Modern Pharmaceutics*, Banker y Rhodes, 4^a Ed., Informa Healthcare (2002); y *Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics*, 10^a ed., McGraw-Hill (2001).

35 Los compuestos de la presente invención pueden ser formulados para administración parenteral por inyección, p. ej., por inyección en bolo o infusión continua. Los compuestos se pueden administrar por infusión continua por vía subcutánea a lo largo de un período de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 24 horas. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, por ejemplo en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante incorporado. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

45 Para administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente mediante la combinación de dichos compuestos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los compuestos de la invención sean formulados en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por el paciente que ha de ser tratado. Los preparados farmacéuticos para uso oral pueden ser obtenidos añadiendo un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir los agentes auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, cargas tales como azúcares, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparados de celulosa tales como, pero sin limitarse a ellos, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica, y polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como, pero sin limitarse a ellos, polivinil pirrolidona entrecruzada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico.

55 Pueden proporcionarse núcleos de grageas con recubrimientos adecuados. Para este propósito, pueden usarse soluciones de azúcar concentradas, que opcionalmente pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de las grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

5 Los preparados farmacéuticos que pueden usarse por vía oral incluyen, pero sin limitarse a ellos, cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como, p. ej., lactosa, aglutinantes tales como, p. ej., almidones, y/o lubricantes tales como, p. ej., talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para tal administración.

10 Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de, p. ej., comprimidos o pastillas formuladas de una manera convencional.

15 Para la administración por inhalación, los compuestos para ser usados de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de aerosol de pulverización de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, p. ej. de gelatina, para ser usadas en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

20 Los compuestos de la presente invención también pueden formularse en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos de la presente invención pueden también formularse como preparado de depósito o de liberación lenta. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular.

25 Las inyecciones de depósito pueden administrarse entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 meses, o en intervalos más largos. Así, p. ej., los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, p. ej., como una sal escasamente soluble.

30 En la administración transdérmica, los compuestos de la presente invención, por ejemplo, se pueden aplicar a un emplasto, o se pueden aplicar por sistemas terapéuticos transdérmicos, que se suministran al organismo en consecuencia.

Las composiciones farmacéuticas de los compuestos pueden comprender también vehículos o excipientes adecuados en fase sólida o en gel. Los ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, pero sin limitarse a ellos, carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como, p. ej., polietilenglicoles.

35 Los compuestos de la presente invención se pueden administrar también en combinación con otros ingredientes activos, tales como, por ejemplo, coadyuvantes, inhibidores de proteasa, u otros fármacos o compuestos compatibles en donde se ve que tal combinación es deseable o ventajosa para el logro de los efectos deseados de los métodos descritos en el presente texto.

40 Los métodos que siguen se usan para ilustrar las diversas realizaciones de la presente invención. Los métodos son a título de ejemplo y no se ha de entender que limiten la invención.

EJEMPLO 1

El presente ejemplo ilustra la generación de enzimas mutantes condroitinasa ABCI ejemplares y ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención.

45 Clonación de cABCI de tipo silvestre: Se generó condroitinasa ABCI mediante PCR usando el cADN de longitud completa de *P. vulgaris* y se clonó en el vector de expresión pET15b en los sitios *NdeI* y *BamHI*. El vector se expresó en *E. coli* (Prabhakar V, et al. Biochem J. 2005).

50 Mutagénesis aleatoria de cABCI: El gen de condroitinasa ABCI se dividió en cuatro módulos. Se realizó la mutagénesis aleatoria en cada uno de los módulos, usando el kit GeneMorph II (Stratagene) para crear un producto que contiene 1-2 cambios de aminoácidos por mutante. Los productos fueron clonados y transformados en DH10B de *E. coli* de forma que el número de colonias obtenidas que contienen la estructura correcta del clon era de al menos 5 veces el número de genes mutantes individuales que se predice que existen en la población de ADN. Las colonias se agruparon y el ADN de plásmido se purificó y se utilizó para transformar la cepa de expresión, BL21.

Ensayo de estrés térmico: Cepas de *E. coli* que expresan las enzimas cABCI mutadas se sembraron en placa clonalmente para crecimiento e inducción (Overnight Express, Novagen) en placas de 96 pocillos. También se

5 incluyeron *E. coli* que expresan la enzima de tipo silvestre. La proteína total se extrajo de los sedimentos de bacterias resultantes usando BPER (PIERCE) seguido por una dilución 1:50 con PBS. Las muestras fueron sometidas a un estrés térmico de 42 °C en un incubador humidificado durante 2 horas. Las muestras se mezclaron después con un volumen igual de sulfato de condroitina C de 0,25 mg/ml (Sigma), un sustrato de cABC1 que tiene por resultado la escisión de las cadenas GAG. Después de una incubación a temperatura ambiente de 10 minutos, se añadió reactivo DMB, y se midió la absorbancia a 660 nm. Las identificaciones positivas con medidas de absorbancia mayores que la enzima de tipo silvestre en la misma placa se contaron como éxitos positivos, indicando mayor actividad después del estrés térmico.

10 Creación de la biblioteca recombinada: Los diez clones más resistentes térmicamente de los módulos A, B y C fueron recombinados de manera aleatoria para producir una biblioteca de productos combinatoria. Los productos de la PCR de cada módulo se combinaron en una relación equimolar, con un equivalente molar del correspondiente tipo silvestre también presente. Esto creó un grupo de 9 secuencias variantes para el Módulo C, y un agrupamiento de 11 variantes para los dos módulos A y B. Se realizó una ligación de 3 vías en la que cada módulo sólo podía ser ligado en la orientación correcta con el módulo o módulos flanqueante apropiados y se ligó en el ADN del vector pET15b para producir clones de expresión que contienen cABC1 de longitud completa. El tamaño total de esta biblioteca es 1089 secuencias cABC1 variantes. El número de colonias obtenidas que contienen la estructura clónica correcta era de al menos 5 veces el número de genes mutantes individuales previsto. La ligación se ponderó para producir en su mayor parte clones que contienen dos o tres módulos mutantes, creando de esta manera nuevas combinaciones de las mutaciones identificadas en los "hits" (identificaciones) del cribado inicial.

20 **EJEMPLO 2**

El presente ejemplo ilustra a título de ejemplo enzimas mutantes condroitinasa de la presente invención.

25 Se confirmó que se generan mutantes térmicamente estables por medio del proceso de evolución molecular. El ensayo de DMB modificado identificó los clones con mayor estabilidad térmica a 42 °C durante 2 horas, en comparación con cABC1 de tipo silvestre. Es probable que la estabilidad a esta temperatura confiera mayor estabilidad a 37 °C, permitiendo la facilidad de manipulación y el suministro para los estudios *in vivo*, ya que pudieron ser utilizadas minibombas permanentes para la dosificación. Los módulos individuales tuvieron como resultado un margen esperado de identificaciones positivas globalmente, como se define por los parámetros de estudio.

30 Los clones que tienen una mayor estabilidad térmica fueron caracterizados por secuenciación. Todas las secuencias de nucleótidos y aminoácidos son indicadas como el tipo silvestre y después la versión mutante (tipo silvestre a mutante).

Enzima mutante condroitinasa ABC1 (proteína)	Secuencia aminoácidos de	Condroitinasa ABC1 mutante (ácido nucleico)	Secuencia de nucleótidos de
Proteína 055D2-3 (SEC ID N° 1)	E256 a K256	Ácido nucleico 055D2-3 (SEC ID N° 9)	T450 a C450 G766 a A766 C2295 a T2295
Proteína 079B6-2 (SEC ID N° 2)	D683 a N683	Ácido nucleico 079B6-2 (SEC ID N° 10)	G2047 a A2047
Proteína 079D2-2 (SEC ID N° 3)		Ácido nucleico 079D2-2 (SEC ID N° 11)	A1773 a G1773 G1980 a A1980 T2068 a C2068 A2076 a G2076
Proteína 057G1-1 (SEC ID N° 4)		Ácido nucleico 057G1-1 (SEC ID N° 12)	G483 a A483 T1110 a C1110 T1821 a C1821
Proteína 023G6-4 (SEC ID N° 5)	I919 a F919 A736 a P736	Ácido nucleico 023G6-4 (SEC ID N° 13)	A2755 a T2755 G2206 a C2206

Enzima mutante condroitinasa ABCI (proteína)	Secuencia de aminoácidos	de	Condroitinasa ABCI mutante (ácido nucleico)	de	Secuencia de nucleótidos
Proteína 005B12-3 (SEC ID N° 6)	E296 a K296		Ácido nucleico 005B12-3 (SEC ID N° 14)		G985 a A985

EJEMPLO 3

5 Evaluación de la Estabilidad - Estabilidad a 37 °C del Lisado Bacteriano. Condroitinasa ABCI de tipo silvestre y variante que expresan *E. coli* fueron expandidas y expresadas en placas de 96 pocillos. Se prepararon extractos de proteína a partir de los sedimentos bacterianos resultantes. Los sedimentos se lisaron con BPER (Pierce) durante diez minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1000 g para sedimentar cualquier material insolubilizado. Los sobrenadantes se transfirieron a recipientes nuevos. El contenido de proteína se normalizó usando un ensayo de proteína BCA. Los lisados también se analizaron en geles de SDS-PAGE y se tñeron con Coomassie. La cantidad de enzima producida se determinó utilizando el software GeneTools (Syngene) comparando el tamaño de la banda de enzima con todas las demás bandas de proteína extraída (histograma copiado al final del documento). El porcentaje de enzima sobre la base de la proteína total del lisado de células se muestra en la Figura 1.

10 Las muestras fueron sometidas a un estrés térmico de 37 °C en un incubador humidificado. Se midió la actividad en incrementos a lo largo del tiempo usando un ensayo DMB colorimétrico (dimetil, azul de metileno). Las muestras se mezclaron con un volumen igual de 0,25 mg/ml de sulfato de condroitina C, un sustrato de la condroitinasa ABCI que resulta en la segmentación de las cadenas GAG. Después de una incubación de diez minutos a temperatura ambiente se añadió reactivo DMB y se midió la absorbancia a 660 nm. Los resultados se representan en la Figura 2 y en las Tablas IA y IB que siguen.

Tabla 1A: Tiempo (días) a 37 °C

	0,00	0,71	1,00	1,65	2,81	3,69	4,69	9,69	11,69
057G1-1	0,94	1,04	0,88	1,05	0,90	1,18	1,04	0,90	0,69
023G6-4	0,94	1,06	1,03	1,05	0,92	1,22	1,04	1,04	1,08
005B12-3	0,97	1,08	0,91	1,10	0,93	1,24	1,11	1,09	0,97
079D2-2	0,93	1,06	0,92	1,05	0,90	1,18	1,02	0,85	0,72
079B6-2	0,93	1,08	0,89	1,05	1,05	1,18	1,07	1,12	1,12
021B8-3	0,97	1,07	0,91	1,08	0,95	1,22	1,08	1,07	0,92
055D2-3	0,92	1,03	0,86	1,06	0,92	1,15	1,04	1,03	0,92
+cABC1	0,95	1,07	1,02	1,09	0,18	0,09	0,03	0,08	-0,03

20 Tabla 1B: Tiempo (días) a 37 °C (continuación)

	13,69	16,69	18,69	20,69	23,69	25,69	27,69	31,69
057G1-1	0,30	0,20	0,19	-0,01	0,06	0,09	0,11	0,08
023G6-4	1,00	0,95	0,60	0,01	0,09	0,16	0,18	0,05
005B12-3	0,63	0,49	0,46	0,02	0,02	0,03	0,09	0,15
079D2-2	0,32	0,28	0,32	0,06	0,18	0,23	0,09	0,08
079B6-2	1,07	1,07	0,94	0,73	0,38	0,42	0,27	0,14
021B8-3	0,42	1,19	0,15	0,08	0,22	0,10	0,10	0,03
055D2-3	0,57	0,21	0,29	0,30	0,21	0,14	0,14	0,11
+cABC1	0,02	-0,13	0,06	-0,01	0,05	0,06	0,09	0,05

EJEMPLO 4

5 Estabilidad a 37 ° C semipurificado. Todas las enzimas procedentes de *E. coli* que expresa condroitinasa ABCI de tipo silvestre y variante se purificaron usando una columna SP de alta velocidad. Las muestras de proteína se normalizaron mediante la A280 para coincidir con la lectura de la absorbancia de la enzima nativa (0,35) por dilución en tampón para elución (acetato de Na 20 mM + NaCl 250 mM). También se reconstituyó una enzima cABCI totalmente purificada y se diluyó hasta una A280 de 0,35 la misma que la muestra nativa semipurificada. Se tomaron lecturas de actividad inicial para todas las muestras usando un ensayo espectrofotométrico de sustrato de condroitina C. El ensayo mide el producto producido por la digestión de sulfato de condroitina C a lo largo del tiempo a A232. Las muestras fueron sometidas a un estrés térmico de 37 °C en un incubador humidificado. Se tomaron lecturas de la actividad todos los días hasta que la muestra nativa perdió toda la actividad. El ensayo de las muestras restantes continuó 3 veces por semana. Las lecturas de actividad mostradas como porcentaje de la actividad total retenida para unas pocas variantes se presentan en la Figura 3 y en las Tablas 2A y 2B que siguen.

Tabla 2A: Tiempo (días) a 37 °C

	0,50	1,50	2,50	3,79	4,79	5,79
cABCI	56,43	34,45	25,48	14,42	8,63	5,77
023G6-1	58,32	42,28	41,70	31,96	24,61	19,82
0,79B6-2	65,23	54,21	44,96	35,14	19,09	17,93
cABCI purificada	33,78	18,64	11,21	4,51	1,59	0,66

15

Tabla 2B:

	6,79	8,79	11,79	13,79	15,79	18,79
cABCI	3,55	2,23	0,74	0,00	0,00	0,00
023G6-1	15,23	12,41	9,00	6,74	3,76	1,86
0,79B6-2	13,89	10,76	5,02	2,89	1,51	1,10
cABCI purificada	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

EJEMPLO 5

20 Estabilidad de condroitinasa mutante después del tratamiento con UV. Después del crecimiento y la expresión, se extrae un mutante de condroitinasa usando BPER (Pierce) como anteriormente y se expone a la luz UV. La actividad de liasa de la condroitina se mide mediante un ensayo de DMB.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Acorda Therapeutics, Inc. Caggiano, Anthony O. Iaci, Jennifer Vecchione, Andrea
 <120> Composiciones y métodos de uso de mutantes de condroitinasa ABCI

<130> 127304.03202

10 <140> todavía sin asignar
 <141> 10-10-2007

<150> 60/828,800
 <151> 10-10-2006

15 <160> 14

<170> PatentIn versión 3.4

20 <210> 1
 <211> 997
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Proteus vulgaris

<400> 1

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Phe Asp Pro Lys Asn Leu Met Gln Ser Glu
 1 5 10 15

Ile Tyr His Phe Ala Gln Asn Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser Ser Asp
 20 25 30

Lys Asn Ser Ile Leu Thr Leu Ser Asp Lys Arg Ser Ile Met Gly Asn
 35 40 45

Gln Ser Leu Leu Trp Lys Trp Lys Gly Gly Ser Ser Phe Thr Leu His
 50 55 60

Lys Lys Leu Ile Val Pro Thr Asp Lys Glu Ala Ser Lys Ala Trp Gly
 65 70 75 80

Arg Ser Ser Thr Pro Val Phe Ser Phe Trp Leu Tyr Asn Glu Lys Pro
 85 90 95

Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ile Asp Phe Gly Glu Lys Leu Ile Ser Thr
 100 105 110

Ser Glu Ala Gln Ala Gly Phe Lys Val Lys Leu Asp Phe Thr Gly Trp
 115 120 125

30

ES 2 473 610 T3

Arg Thr Val Gly Val Ser Leu Asn Asn Asp Leu Glu Asn Arg Glu Met
 130 135 140

Thr Leu Asn Ala Thr Asn Thr Ser Ser Asp Gly Thr Gln Asp Ser Ile
 145 150 155 160

Gly Arg Ser Leu Gly Ala Lys Val Asp Ser Ile Arg Phe Lys Ala Pro
 165 170 175

Ser Asn Val Ser Gln Gly Glu Ile Tyr Ile Asp Arg Ile Met Phe Ser
 180 185 190

Val Asp Asp Ala Arg Tyr Gln Trp Ser Asp Tyr Gln Val Lys Thr Arg
 195 200 205

Leu Ser Glu Pro Glu Ile Gln Phe His Asn Val Lys Pro Gln Leu Pro
 210 215 220

Val Thr Pro Glu Asn Leu Ala Ala Ile Asp Leu Ile Arg Gln Arg Leu
 225 230 235 240

Ile Asn Glu Phe Val Gly Gly Glu Lys Glu Thr Asn Leu Ala Leu Lys
 245 250 255

Glu Asn Ile Ser Lys Leu Lys Ser Asp Phe Asp Ala Leu Asn Thr His
 260 265 270

Thr Leu Ala Asn Gly Gly Thr Gln Gly Arg His Leu Ile Thr Asp Lys
 275 280 285

Gln Ile Ile Ile Tyr Gln Pro Glu Asn Leu Asn Ser Gln Asp Lys Gln
 290 295 300

Leu Phe Asp Asn Tyr Val Ile Leu Gly Asn Tyr Thr Thr Leu Met Phe
 305 310 315 320

Asn Ile Ser Arg Ala Tyr Val Leu Glu Lys Asp Pro Thr Gln Lys Ala
 325 330 335

Gln Leu Lys Gln Met Tyr Leu Leu Met Thr Lys His Leu Leu Asp Gln
 340 345 350

Gly Phe Val Lys Gly Ser Ala Leu Val Thr Thr His His Trp Gly Tyr
 355 360 365

Ser Ser Arg Trp Trp Tyr Ile Ser Thr Leu Leu Met Ser Asp Ala Leu
 370 375 380

ES 2 473 610 T3

Lys Glu Ala Asn Leu Gln Thr Gln Val Tyr Asp Ser Leu Leu Trp Tyr
 385 390 395 400
 Ser Arg Glu Phe Lys Ser Ser Phe Asp Met Lys Val Ser Ala Asp Ser
 405 410 415
 Ser Asp Leu Asp Tyr Phe Asn Thr Leu Ser Arg Gln His Leu Ala Leu
 420 425 430
 Leu Leu Leu Glu Pro Asp Asp Gln Lys Arg Ile Asn Leu Val Asn Thr
 435 440 445
 Phe Ser His Tyr Ile Thr Gly Ala Leu Thr Gln Val Pro Pro Gly Gly
 450 455 460
 Lys Asp Gly Leu Arg Pro Asp Gly Thr Ala Trp Arg His Glu Gly Asn
 465 470 475 480
 Tyr Pro Gly Tyr Ser Phe Pro Ala Phe Lys Asn Ala Ser Gln Leu Ile
 485 490
 Tyr Leu Leu Arg Asp Thr Pro Phe Ser Val Gly Glu Ser Gly Trp Asn
 500 505 510
 Ser Leu Lys Lys Ala Met Val Ser Ala Trp Ile Tyr Ser Asn Pro Glu
 515 520 525
 Val Gly Leu Pro Leu Ala Gly Arg His Pro Leu Asn Ser Pro Ser Leu
 530 535 540
 Lys Ser Val Ala Gln Gly Tyr Tyr Trp Leu Ala Met Ser Ala Lys Ser
 545 550 555 560
 Ser Pro Asp Lys Thr Leu Ala Ser Ile Tyr Leu Ala Ile Ser Asp Lys
 565 570 575
 Thr Gln Asn Glu Ser Thr Ala Ile Phe Gly Glu Thr Ile Thr Pro Ala
 580 585 590
 Ser Leu Pro Gln Gly Phe Tyr Ala Phe Asn Gly Gly Ala Phe Gly Ile
 595 600 605
 His Arg Trp Gln Asp Lys Met Val Thr Leu Lys Ala Tyr Asn Thr Asn
 610 615 620
 Val Trp Ser Ser Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Asn Arg Tyr Gly Arg Tyr
 625 630 635 640

ES 2 473 610 T3

Gln Ser His Gly Val Ala Gln Ile Val Ser Asn Gly Ser Gln Leu Ser
645 650 655

Gln Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Trp Asp Trp Asn Arg Met Pro Gly Ala
660 665 670

Thr Thr Ile His Leu Pro Leu Lys Asp Leu Asp Ser Pro Lys Pro His
675 680 685

Thr Leu Met Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Ser Gly Thr Ser Ser Leu
690 695 700

Glu Gly Gln Tyr Gly Met Met Ala Phe Asp Leu Ile Tyr Pro Ala Asn
705 710 715 720

Leu Glu Arg Phe Asp Pro Asn Phe Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Ala
725 730 735

Ala Asp Asn His Leu Ile Phe Ile Gly Ser Asn Ile Asn Ser Ser Asp
740 745 750

Lys Asn Lys Asn Val Glu Thr Thr Leu Phe Gln His Ala Ile Thr Pro
755 760 765

Thr Leu Asn Thr Leu Trp Ile Asn Gly Gln Lys Ile Glu Asn Met Pro
770 775 780

Tyr Gln Thr Thr Leu Gln Gln Gly Asp Trp Leu Ile Asp Ser Asn Gly
785 790 795 800

Asn Gly Tyr Leu Ile Thr Gln Ala Glu Lys Val Asn Val Ser Arg Gln
805 810 815

His Gln Val Ser Ala Glu Asn Lys Asn Arg Gln Pro Thr Glu Gly Asn
820 825 830

Phe Ser Ser Ala Trp Ile Asp His Ser Thr Arg Pro Lys Asp Ala Ser
835 840 845

Tyr Glu Tyr Met Val Phe Leu Asp Ala Thr Pro Glu Lys Met Gly Glu
850 855 860

Met Ala Gln Lys Phe Arg Glu Asn Asn Gly Leu Tyr Gln Val Leu Arg
865 870 875 880

Lys Asp Lys Asp Val His Ile Ile Leu Asp Lys Leu Ser Asn Val Thr

ES 2 473 610 T3

				885						890						895	
Gly	Tyr	Ala	Phe	Tyr	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Glu	Asp	Lys	Trp	Ile	Lys		
			900					905					910				
Lys	Val	Asn	Lys	Pro	Ala	Ile	Val	Met	Thr	His	Arg	Gln	Lys	Asp	Thr		
		915					920					925					
Leu	Ile	Val	Ser	Ala	Val	Thr	Pro	Asp	Leu	Asn	Met	Thr	Arg	Gln	Lys		
	930					935					940						
Ala	Ala	Thr	Pro	Val	Thr	Ile	Asn	Val	Thr	Ile	Asn	Gly	Lys	Trp	Gln		
945					950					955					960		
Ser	Ala	Asp	Lys	Asn	Ser	Glu	Val	Lys	Tyr	Gln	Val	Ser	Gly	Asp	Asn		
				965					970					975			
Thr	Glu	Leu	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ile	Pro	Gln	Glu	Ile	Lys		
			980					985					990				
Leu	Ser	Pro	Leu	Pro													
			995														

<210> 2
 <211> 997
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Proteus vulgaris

10

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

ES 2 473 610 T3

Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ile Asp Phe Gly Glu Lys Leu Ile Ser Thr
 100 105 110

Ser Glu Ala Gln Ala Gly Phe Lys Val Lys Leu Asp Phe Thr Gly Trp
 115 120 125

Arg Thr Val Gly Val Ser Leu Asn Asn Asp Leu Glu Asn Arg Glu Met
 130 135 140

Thr Leu Asn Ala Thr Asn Thr Ser Ser Asp Gly Thr Gln Asp Ser Ile
 145 150 155 160

Gly Arg Ser Leu Gly Ala Lys Val Asp Ser Ile Arg Phe Lys Ala Pro
 165 170 175

Ser Asn Val Ser Gln Gly Glu Ile Tyr Ile Asp Arg Ile Met Phe Ser
 180 185 190

Val Asp Asp Ala Arg Tyr Gln Trp Ser Asp Tyr Gln Val Lys Thr Arg
 195 200 205

Leu Ser Glu Pro Glu Ile Gln Phe His Asn Val Lys Pro Gln Leu Pro
 210 215 220

Val Thr Pro Glu Asn Leu Ala Ala Ile Asp Leu Ile Arg Gln Arg Leu
 225 230 235 240

Ile Asn Glu Phe Val Gly Gly Glu Lys Glu Thr Asn Leu Ala Leu Glu
 245 250 255

Glu Asn Ile Ser Lys Leu Lys Ser Asp Phe Asp Ala Leu Asn Thr His
 260 265 270

Thr Leu Ala Asn Gly Gly Thr Gln Gly Arg His Leu Ile Thr Asp Lys
 275 280 285

Gln Ile Ile Ile Tyr Gln Pro Glu Asn Leu Asn Ser Gln Asp Lys Gln
 290 295 300

Leu Phe Asp Asn Tyr Val Ile Leu Gly Asn Tyr Thr Thr Leu Met Phe
 305 310 315 320

Asn Ile Ser Arg Ala Tyr Val Leu Glu Lys Asp Pro Thr Gln Lys Ala
 325 330 335

Gln Leu Lys Gln Met Tyr Leu Leu Met Thr Lys His Leu Leu Asp Gln

ES 2 473 610 T3

340					345					350					
Gly	Phe	Val	Lys	Gly	Ser	Ala	Leu	Val	Thr	Thr	His	His	Trp	Gly	Tyr
		355					360					365			
Ser	Ser	Arg	Trp	Trp	Tyr	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Met	Ser	Asp	Ala	Leu
	370					375					380				
Lys	Glu	Ala	Asn	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Tyr	Asp	Ser	Leu	Leu	Trp	Tyr
385					390					395					400
Ser	Arg	Glu	Phe	Lys	Ser	Ser	Phe	Asp	Met	Lys	Val	Ser	Ala	Asp	Ser
				405					410					415	
Ser	Asp	Leu	Asp	Tyr	Phe	Asn	Thr	Leu	Ser	Arg	Gln	His	Leu	Ala	Leu
			420					425					430		
Leu	Leu	Leu	Glu	Pro	Asp	Asp	Gln	Lys	Arg	Ile	Asn	Leu	Val	Asn	Thr
		435					440					445			
Phe	Ser	His	Tyr	Ile	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr	Gln	Val	Pro	Pro	Gly	Gly
	450					455					460				
Lys	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Asp	Gly	Thr	Ala	Trp	Arg	His	Glu	Gly	Asn
465					470					475					480
Tyr	Pro	Gly	Tyr	Ser	Phe	Pro	Ala	Phe	Lys	Asn	Ala	Ser	Gln	Leu	Ile
				485					490					495	
Tyr	Leu	Leu	Arg	Asp	Thr	Pro	Phe	Ser	Val	Gly	Glu	Ser	Gly	Trp	Asn
			500					505					510		
Ser	Leu	Lys	Lys	Ala	Met	Val	Ser	Ala	Trp	Ile	Tyr	Ser	Asn	Pro	Glu
		515					520					525			
Val	Gly	Leu	Pro	Leu	Ala	Gly	Arg	His	Pro	Leu	Asn	Ser	Pro	Ser	Leu
	530					535					540				
Lys	Ser	Val	Ala	Gln	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Leu	Ala	Met	Ser	Ala	Lys	Ser
545				550						555					560
Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	Leu	Ala	Ser	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ile	Ser	Asp	Lys
				565					570					575	
Thr	Gln	Asn	Glu	Ser	Thr	Ala	Ile	Phe	Gly	Glu	Thr	Ile	Thr	Pro	Ala
			580					585					590		

ES 2 473 610 T3

Ser Leu Pro Gln Gly Phe Tyr Ala Phe Asn Gly Gly Ala Phe Gly Ile
 595 600 605

His Arg Trp Gln Asp Lys Met Val Thr Leu Lys Ala Tyr Asn Thr Asn
 610 615 620

Val Trp Ser Ser Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Asn Arg Tyr Gly Arg Tyr
 625 630 635 640

Gln Ser His Gly Val Ala Gln Ile Val Ser Asn Gly Ser Gln Leu Ser
 645 650 655

Gln Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Trp Asp Trp Asn Arg Met Pro Gly Ala
 660 665 670

Thr Thr Ile His Leu Pro Leu Lys Asp Leu Asn Ser Pro Lys Pro His
 675 680 685

Thr Leu Met Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Ser Gly Thr Ser Ser Leu
 690 695 700

Glu Gly Gln Tyr Gly Met Met Ala Phe Asp Leu Ile Tyr Pro Ala Asn
 705 710 715 720

Leu Glu Arg Phe Asp Pro Asn Phe Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Ala
 725 730 735

Ala Asp Asn His Leu Ile Phe Ile Gly Ser Asn Ile Asn Ser Ser Asp
 740 745 750

Lys Asn Lys Asn Val Glu Thr Thr Leu Phe Gln His Ala Ile Thr Pro
 755 760 765

Thr Leu Asn Thr Leu Trp Ile Asn Gly Gln Lys Ile Glu Asn Met Pro
 770 775 780

Tyr Gln Thr Thr Leu Gln Gln Gly Asp Trp Leu Ile Asp Ser Asn Gly
 785 790 795 800

Asn Gly Tyr Leu Ile Thr Gln Ala Glu Lys Val Asn Val Ser Arg Gln
 805 810 815

His Gln Val Ser Ala Glu Asn Lys Asn Arg Gln Pro Thr Glu Gly Asn
 820 825 830

Phe Ser Ser Ala Trp Ile Asp His Ser Thr Arg Pro Lys Asp Ala Ser
 835 840 845

ES 2 473 610 T3

Tyr Glu Tyr Met Val Phe Leu Asp Ala Thr Pro Glu Lys Met Gly Glu
850 855 860

Met Ala Gln Lys Phe Arg Glu Asn Asn Gly Leu Tyr Gln Val Leu Arg
865 870 875 880

Lys Asp Lys Asp Val His Ile Ile Leu Asp Lys Leu Ser Asn Val Thr
885 890 895

Gly Tyr Ala Phe Tyr Gln Pro Ala Ser Ile Glu Asp Lys Trp Ile Lys
900 905 910

Lys Val Asn Lys Pro Ala Ile Val Met Thr His Arg Gln Lys Asp Thr
915 920 925

Leu Ile Val Ser Ala Val Thr Pro Asp Leu Asn Met Thr Arg Gln Lys
930 935 940

Ala Ala Thr Pro Val Thr Ile Asn Val Thr Ile Asn Gly Lys Trp Gln
945 950 955 960

Ser Ala Asp Lys Asn Ser Glu Val Lys Tyr Gln Val Ser Gly Asp Asn
965 970 975

Thr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Tyr Phe Gly Ile Pro Gln Glu Ile Lys
980 985 990

Leu Ser Pro Leu Pro
995

<210> 3
<211> 997
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Proteus Vulgaris

10 <400> 3

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Phe Asp Pro Lys Asn Leu Met Gln Ser Glu
1 5 10 15

Ile Tyr His Phe Ala Gln Asn Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser Ser Asp
20 25 30

Lys Asn Ser Ile Leu Thr Leu Ser Asp Lys Arg Ser Ile Met Gly Asn
35 40 45

ES 2 473 610 T3

Gln Ser Leu Leu Trp Lys Trp Lys Gly Gly Ser Ser Phe Thr Leu His
50 55 60

Lys Lys Leu Ile Val Pro Thr Asp Lys Glu Ala Ser Lys Ala Trp Gly
65 70 75 80

Arg Ser Ser Thr Pro Val Phe Ser Phe Trp Leu Tyr Asn Glu Lys Pro
85 90 95

Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ile Asp Phe Gly Glu Lys Leu Ile Ser Thr
100 105 110

Ser Glu Ala Gln Ala Gly Phe Lys Val Lys Leu Asp Phe Thr Gly Trp
115 120 125

Arg Thr Val Gly Val Ser Leu Asn Asn Asp Leu Glu Asn Arg Glu Met
130 135 140

Thr Leu Asn Ala Thr Asn Thr Ser Ser Asp Gly Thr Gln Asp Ser Ile
145 150 155 160

Gly Arg Ser Leu Gly Ala Lys Val Asp Ser Ile Arg Phe Lys Ala Pro
165 170 175

Ser Asn Val Ser Gln Gly Glu Ile Tyr Ile Asp Arg Ile Met Phe Ser
180 185 190

Val Asp Asp Ala Arg Tyr Gln Trp Ser Asp Tyr Gln Val Lys Thr Arg
195 200 205

Leu Ser Glu Pro Glu Ile Gln Phe His Asn Val Lys Pro Gln Leu Pro
210 215 220

Val Thr Pro Glu Asn Leu Ala Ala Ile Asp Leu Ile Arg Gln Arg Leu
225 230 235 240

Ile Asn Glu Phe Val Gly Gly Glu Lys Glu Thr Asn Leu Ala Leu Glu
245 250 255

Glu Asn Ile Ser Lys Leu Lys Ser Asp Phe Asp Ala Leu Asn Thr His
260 265 270

Thr Leu Ala Asn Gly Gly Thr Gln Gly Arg His Leu Ile Thr Asp Lys
275 280 285

Gln Ile Ile Ile Tyr Gln Pro Glu Asn Leu Asn Ser Gln Asp Lys Gln
290 295 300

ES 2 473 610 T3

Leu Phe Asp Asn Tyr Val Ile Leu Gly Asn Tyr Thr Thr Leu Met Phe
 305 310 315 320
 Asn Ile Ser Arg Ala Tyr Val Leu Glu Lys Asp Pro Thr Gln Lys Ala
 325 330 335
 Gln Leu Lys Gln Met Tyr Leu Leu Met Thr Lys His Leu Leu Asp Gln
 340 345 350
 Gly Phe Val Lys Gly Ser Ala Leu Val Thr Thr His His Trp Gly Tyr
 355 360 365
 Ser Ser Arg Trp Trp Tyr Ile Ser Thr Leu Leu Met Ser Asp Ala Leu
 370 375 380
 Lys Glu Ala Asn Leu Gln Thr Gln Val Tyr Asp Ser Leu Leu Trp Tyr
 385 390 395 400
 Ser Arg Glu Phe Lys Ser Ser Phe Asp Met Lys Val Ser Ala Asp Ser
 405 410 415
 Ser Asp Leu Asp Tyr Phe Asn Thr Leu Ser Arg Gln His Leu Ala Leu
 420 425 430
 Leu Leu Leu Glu Pro Asp Asp Gln Lys Arg Ile Asn Leu Val Asn Thr
 435 440 445
 Phe Ser His Tyr Ile Thr Gly Ala Leu Thr Gln Val Pro Pro Gly Gly
 450 455 460
 Lys Asp Gly Leu Arg Pro Asp Gly Thr Ala Trp Arg His Glu Gly Asn
 465 470 475 480
 Tyr Pro Gly Tyr Ser Phe Pro Ala Phe Lys Asn Ala Ser Gln Leu Ile
 485 490 495
 Tyr Leu Leu Arg Asp Thr Pro Phe Ser Val Gly Glu Ser Gly Trp Asn
 500 505 510
 Ser Leu Lys Lys Ala Met Val Ser Ala Trp Ile Tyr Ser Asn Pro Glu
 515 520 525
 Val Gly Leu Pro Leu Ala Gly Arg His Pro Leu Asn Ser Pro Ser Leu
 530 535 540
 Lys Ser Val Ala Gln Gly Tyr Tyr Trp Leu Ala Met Ser Ala Lys Ser
 545 550 555 560

ES 2 473 610 T3

Ser Pro Asp Lys Thr Leu Ala Ser Ile Tyr Leu Ala Ile Ser Asp Lys
565 570 575

Thr Gln Asn Glu Ser Thr Ala Ile Phe Gly Glu Thr Ile Thr Pro Ala
580 585 590

Ser Leu Pro Gln Gly Phe Tyr Ala Phe Asn Gly Gly Ala Phe Gly Ile
595 600 605

His Arg Trp Gln Asp Lys Met Val Thr Leu Lys Ala Tyr Asn Thr Asn
610 615 620

Val Trp Ser Ser Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Asn Arg Tyr Gly Arg Tyr
625 630 635 640

Gln Ser His Gly Val Ala Gln Ile Val Ser Asn Gly Ser Gln Leu Ser
645 650 655

Gln Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Trp Asp Trp Asn Arg Met Pro Gly Ala
660 665 670

Thr Thr Ile His Leu Pro Leu Lys Asp Leu Asp Ser Pro Lys Pro His
675 680 685

Thr Leu Met Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Ser Gly Thr Ser Ser Leu
690 695 700

Glu Gly Gln Tyr Gly Met Met Ala Phe Asp Leu Ile Tyr Pro Ala Asn
705 710 715 720

Leu Glu Arg Phe Asp Pro Asn Phe Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Ala
725 730 735

Ala Asp Asn His Leu Ile Phe Ile Gly Ser Asn Ile Asn Ser Ser Asp
740 745 750

Lys Asn Lys Asn Val Glu Thr Thr Leu Phe Gln His Ala Ile Thr Pro
755 760 765

Thr Leu Asn Thr Leu Trp Ile Asn Gly Gln Lys Ile Glu Asn Met Pro
770 775 780

Tyr Gln Thr Thr Leu Gln Gln Gly Asp Trp Leu Ile Asp Ser Asn Gly
785 790 795 800

Asn Gly Tyr Leu Ile Thr Gln Ala Glu Lys Val Asn Val Ser Arg Gln

ES 2 473 610 T3

			805					810						815	
His	Gln	Val	Ser	Ala	Glu	Asn	Lys	Asn	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu	Gly	Asn
			820					825					830		
Phe	Ser	Ser	Ala	Trp	Ile	Asp	His	Ser	Thr	Arg	Pro	Lys	Asp	Ala	Ser
		835					840					845			
Tyr	Glu	Tyr	Met	Val	Phe	Leu	Asp	Ala	Thr	Pro	Glu	Lys	Met	Gly	Glu
	850					855					860				
Met	Ala	Gln	Lys	Phe	Arg	Glu	Asn	Asn	Gly	Leu	Tyr	Gln	Val	Leu	Arg
865					870					875					880
Lys	Asp	Lys	Asp	Val	His	Ile	Ile	Leu	Asp	Lys	Leu	Ser	Asn	Val	Thr
				885					890					895	
Gly	Tyr	Ala	Phe	Tyr	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Glu	Asp	Lys	Trp	Ile	Lys
			900					905						910	
Lys	Val	Asn	Lys	Pro	Ala	Ile	Val	Met	Thr	His	Arg	Gln	Lys	Asp	Thr
		915					920					925			
Leu	Ile	Val	Ser	Ala	Val	Thr	Pro	Asp	Leu	Asn	Met	Thr	Arg	Gln	Lys
	930					935					940				
Ala	Ala	Thr	Pro	Val	Thr	Ile	Asn	Val	Thr	Ile	Asn	Gly	Lys	Trp	Gln
945					950					955					960
Ser	Ala	Asp	Lys	Asn	Ser	Glu	Val	Lys	Tyr	Gln	Val	Ser	Gly	Asp	Asn
				965					970					975	
Thr	Glu	Leu	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ile	Pro	Gln	Glu	Ile	Lys
			980					985					990		
Leu	Ser	Pro	Leu	Pro											
		995													

<210> 4
 <211> 997
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Proteus Vulgaris

10

<400> 4
 Ala Thr Ser Asn Pro Ala Phe Asp Pro Lys Asn Leu Met Gln Ser Glu
 1 5 10 15

ES 2 473 610 T3

Ile Tyr His Phe Ala Gln Asn Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser Ser Asp
 20 25 30

Lys Asn Ser Ile Leu Thr Leu Ser Asp Lys Arg Ser Ile Met Gly Asn
 35 40 45

Gln Ser Leu Leu Trp Lys Trp Lys Gly Gly Ser Ser Phe Thr Leu His
 50 55 60

Lys Lys Leu Ile Val Pro Thr Asp Lys Glu Ala Ser Lys Ala Trp Gly
 65 70 75 80

Arg Ser Ser Thr Pro Val Phe Ser Phe Trp Leu Tyr Asn Glu Lys Pro
 85 90 95

Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ile Asp Phe Gly Glu Lys Leu Ile Ser Thr
 100 105 110

Ser Glu Ala Gln Ala Gly Phe Lys Val Lys Leu Asp Phe Thr Gly Trp
 115 120 125

Arg Thr Val Gly Val Ser Leu Asn Asn Asp Leu Glu Asn Arg Glu Met
 130 135 140

Thr Leu Asn Ala Thr Asn Thr Ser Ser Asp Gly Thr Gln Asp Ser Ile
 145 150 155 160

Gly Arg Ser Leu Gly Ala Lys Val Asp Ser Ile Arg Phe Lys Ala Pro
 165 170 175

Ser Asn Val Ser Gln Gly Glu Ile Tyr Ile Asp Arg Ile Met Phe Ser
 180 185 190

Val Asp Asp Ala Arg Tyr Gln Trp Ser Asp Tyr Gln Val Lys Thr Arg
 195 200 205

Leu Ser Glu Pro Glu Ile Gln Phe His Asn Val Lys Pro Gln Leu Pro
 210 215 220

Val Thr Pro Glu Asn Leu Ala Ala Ile Asp Leu Ile Arg Gln Arg Leu
 225 230 235 240

Ile Asn Glu Phe Val Gly Gly Glu Lys Glu Thr Asn Leu Ala Leu Glu
 245 250 255

Glu Asn Ile Ser Lys Leu Lys Ser Asp Phe Asp Ala Leu Asn Thr His

ES 2 473 610 T3

260					265					270					
Thr	Leu	Ala	Asn	Gly	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Thr	Asp	Lys
		275					280					285			
Gln	Ile	Ile	Ile	Tyr	Gln	Pro	Glu	Asn	Leu	Asn	Ser	Gln	Asp	Lys	Gln
	290					295					300				
Leu	Phe	Asp	Asn	Tyr	Val	Ile	Leu	Gly	Asn	Tyr	Thr	Thr	Leu	Met	Phe
305					310					315					320
Asn	Ile	Ser	Arg	Ala	Tyr	Val	Leu	Glu	Lys	Asp	Pro	Thr	Gln	Lys	Ala
				325					330					335	
Gln	Leu	Lys	Gln	Met	Tyr	Leu	Leu	Met	Thr	Lys	His	Leu	Leu	Asp	Gln
			340					345					350		
Gly	Phe	Val	Lys	Gly	Ser	Ala	Leu	Val	Thr	Thr	His	His	Trp	Gly	Tyr
		355					360					365			
Ser	Ser	Arg	Trp	Trp	Tyr	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Met	Ser	Asp	Ala	Leu
	370					375					380				
Lys	Glu	Ala	Asn	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Tyr	Asp	Ser	Leu	Leu	Trp	Tyr
385					390					395					400
Ser	Arg	Glu	Phe	Lys	Ser	Ser	Phe	Asp	Met	Lys	Val	Ser	Ala	Asp	Ser
				405					410					415	
Ser	Asp	Leu	Asp	Tyr	Phe	Asn	Thr	Leu	Ser	Arg	Gln	His	Leu	Ala	Leu
			420					425					430		
Leu	Leu	Leu	Glu	Pro	Asp	Asp	Gln	Lys	Arg	Ile	Asn	Leu	Val	Asn	Thr
		435					440					445			
Phe	Ser	His	Tyr	Ile	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr	Gln	Val	Pro	Pro	Gly	Gly
	450					455					460				
Lys	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Asp	Gly	Thr	Ala	Trp	Arg	His	Glu	Gly	Asn
465					470					475					480
Tyr	Pro	Gly	Tyr	Ser	Phe	Pro	Ala	Phe	Lys	Asn	Ala	Ser	Gln	Leu	Ile
				485					490					495	
Tyr	Leu	Leu	Arg	Asp	Thr	Pro	Phe	Ser	Val	Gly	Glu	Ser	Gly	Trp	Asn
			500					505					510		

ES 2 473 610 T3

Ser Leu Lys Lys Ala Met Val Ser Ala Trp Ile Tyr Ser Asn Pro Glu
515 520 525

Val Gly Leu Pro Leu Ala Gly Arg His Pro Leu Asn Ser Pro Ser Leu
530 535 540

Lys Ser Val Ala Gln Gly Tyr Tyr Trp Leu Ala Met Ser Ala Lys Ser
545 550 555 560

Ser Pro Asp Lys Thr Leu Ala Ser Ile Tyr Leu Ala Ile Ser Asp Lys
565 570 575

Thr Gln Asn Glu Ser Thr Ala Ile Phe Gly Glu Thr Ile Thr Pro Ala
580 585 590

Ser Leu Pro Gln Gly Phe Tyr Ala Phe Asn Gly Gly Ala Phe Gly Ile
595 600 605

His Arg Trp Gln Asp Lys Met Val Thr Leu Lys Ala Tyr Asn Thr Asn
610 615 620

Val Trp Ser Ser Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Asn Arg Tyr Gly Arg Tyr
625 630 635 640

Gln Ser His Gly Val Ala Gln Ile Val Ser Asn Gly Ser Gln Leu Ser
645 650 655

Gln Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Trp Asp Trp Asn Arg Met Pro Gly Ala
660 665 670

Thr Thr Ile His Leu Pro Leu Lys Asp Leu Asp Ser Pro Lys Pro His
675 680 685

Thr Leu Met Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Ser Gly Thr Ser Ser Leu
690 695 700

Glu Gly Gln Tyr Gly Met Met Ala Phe Asp Leu Ile Tyr Pro Ala Asn
705 710 715 720

Leu Glu Arg Phe Asp Pro Asn Phe Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Ala
725 730 735

Ala Asp Asn His Leu Ile Phe Ile Gly Ser Asn Ile Asn Ser Ser Asp
740 745 750

Lys Asn Lys Asn Val Glu Thr Thr Leu Phe Gln His Ala Ile Thr Pro
755 760 765

ES 2 473 610 T3

Thr Leu Asn Thr Leu Trp Ile Asn Gly Gln Lys Ile Glu Asn Met Pro
770 775 780

Tyr Gln Thr Thr Leu Gln Gln Gly Asp Trp Leu Ile Asp Ser Asn Gly
785 790 795 800

Asn Gly Tyr Leu Ile Thr Gln Ala Glu Lys Val Asn Val Ser Arg Gln
805 810 815

His Gln Val Ser Ala Glu Asn Lys Asn Arg Gln Pro Thr Glu Gly Asn
820 825 830

Phe Ser Ser Ala Trp Ile Asp His Ser Thr Arg Pro Lys Asp Ala Ser
835 840 845

Tyr Glu Tyr Met Val Phe Leu Asp Ala Thr Pro Glu Lys Met Gly Glu
850 855 860

Met Ala Gln Lys Phe Arg Glu Asn Asn Gly Leu Tyr Gln Val Leu Arg
865 870 875 880

Lys Asp Lys Asp Val His Ile Ile Leu Asp Lys Leu Ser Asn Val Thr
885 890 895

Gly Tyr Ala Phe Tyr Gln Pro Ala Ser Ile Glu Asp Lys Trp Ile Lys
900 905 910

Lys Val Asn Lys Pro Ala Ile Val Met Thr His Arg Gln Lys Asp Thr
915 920 925

Leu Ile Val Ser Ala Val Thr Pro Asp Leu Asn Met Thr Arg Gln Lys
930 935 940

Ala Ala Thr Pro Val Thr Ile Asn Val Thr Ile Asn Gly Lys Trp Gln
945 950 955 960

Ser Ala Asp Lys Asn Ser Glu Val Lys Tyr Gln Val Ser Gly Asp Asn
965 970 975

Thr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Tyr Phe Gly Ile Pro Gln Glu Ile Lys
980 985 990

Leu Ser Pro Leu Pro
995

<210> 5
<211> 997
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Proteus vulgaris

10

ES 2 473 610 T3

<400> 5

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Phe Asp Pro Lys Asn Leu Met Gln Ser Glu
 1 5 10 15

Ile Tyr His Phe Ala Gln Asn Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser Ser Asp
 20 25 30

Lys Asn Ser Ile Leu Thr Leu Ser Asp Lys Arg Ser Ile Met Gly Asn
 35 40 45

Gln Ser Leu Leu Trp Lys Trp Lys Gly Gly Ser Ser Phe Thr Leu His
 50 55 60

Lys Lys Leu Ile Val Pro Thr Asp Lys Glu Ala Ser Lys Ala Trp Gly
 65 70 75 80

Arg Ser Ser Thr Pro Val Phe Ser Phe Trp Leu Tyr Asn Glu Lys Pro
 85 90 95

Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ile Asp Phe Gly Glu Lys Leu Ile Ser Thr
 100 105 110

Ser Glu Ala Gln Ala Gly Phe Lys Val Lys Leu Asp Phe Thr Gly Trp
 115 120 125

Arg Thr Val Gly Val Ser Leu Asn Asn Asp Leu Glu Asn Arg Glu Met
 130 135 140

Thr Leu Asn Ala Thr Asn Thr Ser Ser Asp Gly Thr Gln Asp Ser Ile
 145 150 155 160

Gly Arg Ser Leu Gly Ala Lys Val Asp Ser Ile Arg Phe Lys Ala Pro
 165 170 175

Ser Asn Val Ser Gln Gly Glu Ile Tyr Ile Asp Arg Ile Met Phe Ser
 180 185 190

Val Asp Asp Ala Arg Tyr Gln Trp Ser Asp Tyr Gln Val Lys Thr Arg
 195 200 205

Leu Ser Glu Pro Glu Ile Gln Phe His Asn Val Lys Pro Gln Leu Pro
 210 215 220

ES 2 473 610 T3

Val Thr Pro Glu Asn Leu Ala Ala Ile Asp Leu Ile Arg Gln Arg Leu
 225 230 235 240

Ile Asn Glu Phe Val Gly Gly Glu Lys Glu Thr Asn Leu Ala Leu Glu
 245 250 255

Glu Asn Ile Ser Lys Leu Lys Ser Asp Phe Asp Ala Leu Asn Thr His
 260 265 270

Thr Leu Ala Asn Gly Gly Thr Gln Gly Arg His Leu Ile Thr Asp Lys
 275 280 285

Gln Ile Ile Ile Tyr Gln Pro Glu Asn Leu Asn Ser Gln Asp Lys Gln
 290 295 300

Leu Phe Asp Asn Tyr Val Ile Leu Gly Asn Tyr Thr Thr Leu Met Phe
 305 310 315 320

Asn Ile Ser Arg Ala Tyr Val Leu Glu Lys Asp Pro Thr Gln Lys Ala
 325 330 335

Gln Leu Lys Gln Met Tyr Leu Leu Met Thr Lys His Leu Leu Asp Gln
 340 345 350

Gly Phe Val Lys Gly Ser Ala Leu Val Thr Thr His His Trp Gly Tyr
 355 360 365

Ser Ser Arg Trp Trp Tyr Ile Ser Thr Leu Leu Met Ser Asp Ala Leu
 370 375 380

Lys Glu Ala Asn Leu Gln Thr Gln Val Tyr Asp Ser Leu Leu Trp Tyr
 385 390 395 400

Ser Arg Glu Phe Lys Ser Ser Phe Asp Met Lys Val Ser Ala Asp Ser
 405 410 415

Ser Asp Leu Asp Tyr Phe Asn Thr Leu Ser Arg Gln His Leu Ala Leu
 420 425 430

Leu Leu Leu Glu Pro Asp Asp Gln Lys Arg Ile Asn Leu Val Asn Thr
 435 440 445

Phe Ser His Tyr Ile Thr Gly Ala Leu Thr Gln Val Pro Pro Gly Gly
 450 455 460

Lys Asp Gly Leu Arg Pro Asp Gly Thr Ala Trp Arg His Glu Gly Asn
 465 470 475 480

ES 2 473 610 T3

Tyr Pro Gly Tyr Ser Phe Pro Ala Phe Lys Asn Ala Ser Gln Leu Ile
 485 490 495
 Tyr Leu Leu Arg Asp Thr Pro Phe Ser Val Gly Glu Ser Gly Trp Asn
 500 505 510
 Ser Leu Lys Lys Ala Met Val Ser Ala Trp Ile Tyr Ser Asn Pro Glu
 515 520 525
 Val Gly Leu Pro Leu Ala Gly Arg His Pro Leu Asn Ser Pro Ser Leu
 530 535 540
 Lys Ser Val Ala Gln Gly Tyr Tyr Trp Leu Ala Met Ser Ala Lys Ser
 545 550 555 560
 Ser Pro Asp Lys Thr Leu Ala Ser Ile Tyr Leu Ala Ile Ser Asp Lys
 565 570 575
 Thr Gln Asn Glu Ser Thr Ala Ile Phe Gly Glu Thr Ile Thr Pro Ala
 580 585 590
 Ser Leu Pro Gln Gly Phe Tyr Ala Phe Asn Gly Gly Ala Phe Gly Ile
 595 600 605
 His Arg Trp Gln Asp Lys Met Val Thr Leu Lys Ala Tyr Asn Thr Asn
 610 615 620
 Val Trp Ser Ser Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Asn Arg Tyr Gly Arg Tyr
 625 630 635 640
 Gln Ser His Gly Val Ala Gln Ile Val Ser Asn Gly Ser Gln Leu Ser
 645 650 655
 Gln Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Trp Asp Trp Asn Arg Met Pro Gly Ala
 660 665 670
 Thr Thr Ile His Leu Pro Leu Lys Asp Leu Asp Ser Pro Lys Pro His
 675 680 685
 Thr Leu Met Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Ser Gly Thr Ser Ser Leu
 690 695 700
 Glu Gly Gln Tyr Gly Met Met Ala Phe Asp Leu Ile Tyr Pro Ala Asn
 705 710 715 720
 Leu Glu Arg Phe Asp Pro Asn Phe Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Pro

ES 2 473 610 T3

<211> 997
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Proteus Vulgaris

<400> 6

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Phe Asp Pro Lys Asn Leu Met Gln Ser Glu
 1 5 10 15

Ile Tyr His Phe Ala Gln Asn Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser Ser Asp
 20 25 30

Lys Asn Ser Ile Leu Thr Leu Ser Asp Lys Arg Ser Ile Met Gly Asn
 35 40 45

Gln Ser Leu Leu Trp Lys Trp Lys Gly Gly Ser Ser Phe Thr Leu His
 50 55 60

Lys Lys Leu Ile Val Pro Thr Asp Lys Glu Ala Ser Lys Ala Trp Gly
 65 70 75 80

Arg Ser Ser Thr Pro Val Phe Ser Phe Trp Leu Tyr Asn Glu Lys Pro
 85 90 95

Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ile Asp Phe Gly Glu Lys Leu Ile Ser Thr
 100 105 110

Ser Glu Ala Gln Ala Gly Phe Lys Val Lys Leu Asp Phe Thr Gly Trp
 115 120 125

Arg Thr Val Gly Val Ser Leu Asn Asn Asp Leu Glu Asn Arg Glu Met
 130 135 140

Thr Leu Asn Ala Thr Asn Thr Ser Ser Asp Gly Thr Gln Asp Ser Ile
 145 150 155 160

Gly Arg Ser Leu Gly Ala Lys Val Asp Ser Ile Arg Phe Lys Ala Pro
 165 170 175

Ser Asn Val Ser Gln Gly Glu Ile Tyr Ile Asp Arg Ile Met Phe Ser

10

ES 2 473 610 T3

			180					185					190			
Val	Asp	Asp	Ala	Arg	Tyr	Gln	Trp	Ser	Asp	Tyr	Gln	Val	Lys	Thr	Arg	
		195					200					205				
Leu	Ser	Glu	Pro	Glu	Ile	Gln	Phe	His	Asn	Val	Lys	Pro	Gln	Leu	Pro	
	210					215					220					
Val	Thr	Pro	Glu	Asn	Leu	Ala	Ala	Ile	Asp	Leu	Ile	Arg	Gln	Arg	Leu	
225					230					235					240	
Ile	Asn	Glu	Phe	Val	Gly	Gly	Glu	Lys	Glu	Thr	Asn	Leu	Ala	Leu	Glu	
				245					250					255		
Glu	Asn	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Ser	Asp	Phe	Asp	Ala	Leu	Asn	Thr	His	
			260					265					270			
Thr	Leu	Ala	Asn	Gly	Gly	Thr	Gln	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Thr	Asp	Lys	
		275					280					285				
Gln	Ile	Ile	Ile	Tyr	Gln	Pro	Lys	Asn	Leu	Asn	Ser	Gln	Asp	Lys	Gln	
	290					295					300					
Leu	Phe	Asp	Asn	Tyr	Val	Ile	Leu	Gly	Asn	Tyr	Thr	Thr	Leu	Met	Phe	
305					310					315					320	
Asn	Ile	Ser	Arg	Ala	Tyr	Val	Leu	Glu	Lys	Asp	Pro	Thr	Gln	Lys	Ala	
				325					330					335		
Gln	Leu	Lys	Gln	Met	Tyr	Leu	Leu	Met	Thr	Lys	His	Leu	Leu	Asp	Gln	
			340					345						350		
Gly	Phe	Val	Lys	Gly	Ser	Ala	Leu	Val	Thr	Thr	His	His	Trp	Gly	Tyr	
		355					360					365				
Ser	Ser	Arg	Trp	Trp	Tyr	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Met	Ser	Asp	Ala	Leu	
	370					375					380					
Lys	Glu	Ala	Asn	Leu	Gln	Thr	Gln	Val	Tyr	Asp	Ser	Leu	Leu	Trp	Tyr	
385					390					395					400	
Ser	Arg	Glu	Phe	Lys	Ser	Ser	Phe	Asp	Met	Lys	Val	Ser	Ala	Asp	Ser	
				405					410					415		
Ser	Asp	Leu	Asp	Tyr	Phe	Asn	Thr	Leu	Ser	Arg	Gln	His	Leu	Ala	Leu	
			420					425					430			

ES 2 473 610 T3

Leu Leu Leu Glu Pro Asp Asp Gln Lys Arg Ile Asn Leu Val Asn Thr
 435 440 445
 Phe Ser His Tyr Ile Thr Gly Ala Leu Thr Gln Val Pro Pro Gly Gly
 450 455 460
 Lys Asp Gly Leu Arg Pro Asp Gly Thr Ala Trp Arg His Glu Gly Asn
 465 470 475 480
 Tyr Pro Gly Tyr Ser Phe Pro Ala Phe Lys Asn Ala Ser Gln Leu Ile
 485 490 495
 Tyr Leu Leu Arg Asp Thr Pro Phe Ser Val Gly Glu Ser Gly Trp Asn
 500 505 510
 Ser Leu Lys Lys Ala Met Val Ser Ala Trp Ile Tyr Ser Asn Pro Glu
 515 520 525
 Val Gly Leu Pro Leu Ala Gly Arg His Pro Leu Asn Ser Pro Ser Leu
 530 535 540
 Lys Ser Val Ala Gln Gly Tyr Tyr Trp Leu Ala Met Ser Ala Lys Ser
 545 550 555 560
 Ser Pro Asp Lys Thr Leu Ala Ser Ile Tyr Leu Ala Ile Ser Asp Lys
 565 570 575
 Thr Gln Asn Glu Ser Thr Ala Ile Phe Gly Glu Thr Ile Thr Pro Ala
 580 585 590
 Ser Leu Pro Gln Gly Phe Tyr Ala Phe Asn Gly Gly Ala Phe Gly Ile
 595 600 605
 His Arg Trp Gln Asp Lys Met Val Thr Leu Lys Ala Tyr Asn Thr Asn
 610 615 620
 Val Trp Ser Ser Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Asn Arg Tyr Gly Arg Tyr
 625 630 635 640
 Gln Ser His Gly Val Ala Gln Ile Val Ser Asn Gly Ser Gln Leu Ser
 645 650 655
 Gln Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Trp Asp Trp Asn Arg Met Pro Gly Ala
 660 665 670
 Thr Thr Ile His Leu Pro Leu Lys Asp Leu Asp Ser Pro Lys Pro His
 675 680 685

ES 2 473 610 T3

Thr Leu Met Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Ser Gly Thr Ser Ser Leu
 690 695 700
 Glu Gly Gln Tyr Gly Met Met Ala Phe Asp Leu Ile Tyr Pro Ala Asn
 705 710 715 720
 Leu Glu Arg Phe Asp Pro Asn Phe Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Ala
 725 730 735
 Ala Asp Asn His Leu Ile Phe Ile Gly Ser Asn Ile Asn Ser Ser Asp
 740 745 750
 Lys Asn Lys Asn Val Glu Thr Thr Leu Phe Gln His Ala Ile Thr Pro
 755 760 765
 Thr Leu Asn Thr Leu Trp Ile Asn Gly Gln Lys Ile Glu Asn Met Pro
 770 775 780
 Tyr Gln Thr Thr Leu Gln Gln Gly Asp Trp Leu Ile Asp Ser Asn Gly
 785 790 795 800
 Asn Gly Tyr Leu Ile Thr Gln Ala Glu Lys Val Asn Val Ser Arg Gln
 805 810 815
 His Gln Val Ser Ala Glu Asn Lys Asn Arg Gln Pro Thr Glu Gly Asn
 820 825 830
 Phe Ser Ser Ala Trp Ile Asp His Ser Thr Arg Pro Lys Asp Ala Ser
 835 840 845
 Tyr Glu Tyr Met Val Phe Leu Asp Ala Thr Pro Glu Lys Met Gly Glu
 850 855 860
 Met Ala Gln Lys Phe Arg Glu Asn Asn Gly Leu Tyr Gln Val Leu Arg
 865 870 875 880
 Lys Asp Lys Asp Val His Ile Ile Leu Asp Lys Leu Ser Asn Val Thr
 885 890 895
 Gly Tyr Ala Phe Tyr Gln Pro Ala Ser Ile Glu Asp Lys Trp Ile Lys
 900 905 910
 Lys Val Asn Lys Pro Ala Ile Val Met Thr His Arg Gln Lys Asp Thr
 915 920 925
 Leu Ile Val Ser Ala Val Thr Pro Asp Leu Asn Met Thr Arg Gln Lys
 930 935 940

Ala Ala Thr Pro Val Thr Ile Asn Val Thr Ile Asn Gly Lys Trp Gln
 945 950 955 960

Ser Ala Asp Lys Asn Ser Glu Val Lys Tyr Gln Val Ser Gly Asp Asn
 965 970 975

Thr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Tyr Phe Gly Ile Pro Gln Glu Ile Lys
 980 985 990

Leu Ser Pro Leu Pro
 995

<210> 7
 <211> 997
 <212> PRT
 <213> Proteus vulgaris

5

<400> 7

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Phe Asp Pro Lys Asn Leu Met Gln Ser Glu
 1 5 10 15

Ile Tyr His Phe Ala Gln Asn Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser Ser Asp
 20 25 30

Lys Asn Ser Ile Leu Thr Leu Ser Asp Lys Arg Ser Ile Met Gly Asn
 35 40 45

Gln Ser Leu Leu Trp Lys Trp Lys Gly Gly Ser Ser Phe Thr Leu His
 50 55 60

Lys Lys Leu Ile Val Pro Thr Asp Lys Glu Ala Ser Lys Ala Trp Gly
 65 70 75 80

Arg Ser Ser Thr Pro Val Phe Ser Phe Trp Leu Tyr Asn Glu Lys Pro
 85 90 95

Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ile Asp Phe Gly Glu Lys Leu Ile Ser Thr
 100 105 110

Ser Glu Ala Gln Ala Gly Phe Lys Val Lys Leu Asp Phe Thr Gly Trp
 115 120 125

Arg Thr Val Gly Val Ser Leu Asn Asn Asp Leu Glu Asn Arg Glu Met
 130 135 140

Thr Leu Asn Ala Thr Asn Thr Ser Ser Asp Gly Thr Gln Asp Ser Ile
 145 150 155 160

10

ES 2 473 610 T3

Gly Arg Ser Leu Gly Ala Lys Val Asp Ser Ile Arg Phe Lys Ala Pro
 165 170 175
 Ser Asn Val Ser Gln Gly Glu Ile Tyr Ile Asp Arg Ile Met Phe Ser
 180 185 190
 Val Asp Asp Ala Arg Tyr Gln Trp Ser Asp Tyr Gln Val Lys Thr Arg
 195 200 205
 Leu Ser Glu Pro Glu Ile Gln Phe His Asn Val Lys Pro Gln Leu Pro
 210 215 220
 Val Thr Pro Glu Asn Leu Ala Ala Ile Asp Leu Ile Arg Gln Arg Leu
 225 230 235 240
 Ile Asn Glu Phe Val Gly Gly Glu Lys Glu Thr Asn Leu Ala Leu Glu
 245 250 255
 Glu Asn Ile Ser Lys Leu Lys Ser Asp Phe Asp Ala Leu Asn Thr His
 260 265 270
 Thr Leu Ala Asn Gly Gly Thr Gln Gly Arg His Leu Ile Thr Asp Lys
 275 280 285
 Gln Ile Ile Ile Tyr Gln Pro Glu Asn Leu Asn Ser Gln Asp Lys Gln
 290 295 300
 Leu Phe Asp Asn Tyr Val Ile Leu Gly Asn Tyr Thr Thr Leu Met Phe
 305 310 315 320
 Asn Ile Ser Arg Ala Tyr Val Leu Glu Lys Asp Pro Thr Gln Lys Ala
 325 330 335
 Gln Leu Lys Gln Met Tyr Leu Leu Met Thr Lys His Leu Leu Asp Gln
 340 345 350
 Gly Phe Val Lys Gly Ser Ala Leu Val Thr Thr His His Trp Gly Tyr
 355 360 365
 Ser Ser Arg Trp Trp Tyr Ile Ser Thr Leu Leu Met Ser Asp Ala Leu
 370 375 380
 Lys Glu Ala Asn Leu Gln Thr Gln Val Tyr Asp Ser Leu Leu Trp Tyr
 385 390 395 400
 Ser Arg Glu Phe Lys Ser Ser Phe Asp Met Lys Val Ser Ala Asp Ser

ES 2 473 610 T3

405							410					415			
Ser	Asp	Leu	Asp	Tyr	Phe	Asn	Thr	Leu	Ser	Arg	Gln	His	Leu	Ala	Leu
			420					425					430		
Leu	Leu	Leu	Glu	Pro	Asp	Asp	Gln	Lys	Arg	Ile	Asn	Leu	Val	Asn	Thr
		435					440					445			
Phe	Ser	His	Tyr	Ile	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr	Gln	Val	Pro	Pro	Gly	Gly
	450					455					460				
Lys	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Asp	Gly	Thr	Ala	Trp	Arg	His	Glu	Gly	Asn
465					470					475					480
Tyr	Pro	Gly	Tyr	Ser	Phe	Pro	Ala	Phe	Lys	Asn	Ala	Ser	Gln	Leu	Ile
				485					490					495	
Tyr	Leu	Leu	Arg	Asp	Thr	Pro	Phe	Ser	Val	Gly	Glu	Ser	Gly	Trp	Asn
			500					505					510		
Ser	Leu	Lys	Lys	Ala	Met	Val	Ser	Ala	Trp	Ile	Tyr	Ser	Asn	Pro	Glu
		515					520					525			
Val	Gly	Leu	Pro	Leu	Ala	Gly	Arg	His	Pro	Leu	Asn	Ser	Pro	Ser	Leu
	530					535					540				
Lys	Ser	Val	Ala	Gln	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Leu	Ala	Met	Ser	Ala	Lys	Ser
545					550					555					560
Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	Leu	Ala	Ser	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ile	Ser	Asp	Lys
				565					570					575	
Thr	Gln	Asn	Glu	Ser	Thr	Ala	Ile	Phe	Gly	Glu	Thr	Ile	Thr	Pro	Ala
			580					585					590		
Ser	Leu	Pro	Gln	Gly	Phe	Tyr	Ala	Phe	Asn	Gly	Gly	Ala	Phe	Gly	Ile
		595					600					605			
His	Arg	Trp	Gln	Asp	Lys	Met	Val	Thr	Leu	Lys	Ala	Tyr	Asn	Thr	Asn
	610					615					620				
Val	Trp	Ser	Ser	Glu	Ile	Tyr	Asn	Lys	Asp	Asn	Arg	Tyr	Gly	Arg	Tyr
625					630					635					640
Gln	Ser	His	Gly	Val	Ala	Gln	Ile	Val	Ser	Asn	Gly	Ser	Gln	Leu	Ser
				645					650					655	

ES 2 473 610 T3

Gln Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Trp Asp Trp Asn Arg Met Pro Gly Ala
660 665 670

Thr Thr Ile His Leu Pro Leu Lys Asp Leu Asp Ser Pro Lys Pro His
675 680 685

Thr Leu Met Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Ser Gly Thr Ser Ser Leu
690 695 700

Glu Gly Gln Tyr Gly Met Met Ala Phe Asp Leu Ile Tyr Pro Ala Asn
705 710 715 720

Leu Glu Arg Phe Asp Pro Asn Phe Thr Ala Lys Lys Ser Val Leu Ala
725 730 735

Ala Asp Asn His Leu Ile Phe Ile Gly Ser Asn Ile Asn Ser Ser Asp
740 745 750

Lys Asn Lys Asn Val Glu Thr Thr Leu Phe Gln His Ala Ile Thr Pro
755 760 765

Thr Leu Asn Thr Leu Trp Ile Asn Gly Gln Lys Ile Glu Asn Met Pro
770 775 780

Tyr Gln Thr Thr Leu Gln Gln Gly Asp Trp Leu Ile Asp Ser Asn Gly
785 790 795 800

Asn Gly Tyr Leu Ile Thr Gln Ala Glu Lys Val Asn Val Ser Arg Gln
805 810 815

His Gln Val Ser Ala Glu Asn Lys Asn Arg Gln Pro Thr Glu Gly Asn
820 825 830

Phe Ser Ser Ala Trp Ile Asp His Ser Thr Arg Pro Lys Asp Ala Ser
835 840 845

Tyr Glu Tyr Met Val Phe Leu Asp Ala Thr Pro Glu Lys Met Gly Glu
850 855 860

Met Ala Gln Lys Phe Arg Glu Asn Asn Gly Leu Tyr Gln Val Leu Arg
865 870 875 880

Lys Asp Lys Asp Val His Ile Ile Leu Asp Lys Leu Ser Asn Val Thr
885 890 895

Gly Tyr Ala Phe Tyr Gln Pro Ala Ser Ile Glu Asp Lys Trp Ile Lys
900 905 910

Lys Val Asn Lys Pro Ala Ile Val Met Thr His Arg Gln Lys Asp Thr
 915 920 925

Leu Ile Val Ser Ala Val Thr Pro Asp Leu Asn Met Thr Arg Gln Lys
 930 935 940

Ala Ala Thr Pro Val Thr Ile Asn Val Thr Ile Asn Gly Lys Trp Gln
 945 950 955 960

Ser Ala Asp Lys Asn Ser Glu Val Lys Tyr Gln Val Ser Gly Asp Asn
 965 970 975

Thr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Tyr Phe Gly Ile Pro Gln Glu Ile Lys
 980 985 990

Leu Ser Pro Leu Pro
 995

<210> 8
 <211> 2994
 <212> ADN
 <213> Proteus vulgaris

<400> 8
 gccaccagca atcctgcatt tgatcctaaa aatctgatgc agtcagaaat ttaccatttt 60
 gcacaaaata acccattagc agacttctca tcagataaaa actcaatact aacgttatct 120
 gataaacgta gcattatggg aaaccaatct cttttatgga aatggaaagg tggtagtagc 180
 tttactttac ataaaaaact gattgtcccc accgataaag aagcatctaa agcatgggga 240
 cgctcatcca cccccgtttt ctcattttgg ctttacaatg aaaaaccgat tgatggttat 300
 cttactatcg atttcggaga aaaactcatt tcaaccagtg aggetcaggc aggctttaa 360
 gtaaaattag atttcactgg ctggcgact gtgggagtct ctttaaataa cgatcttgaa 420
 aatcgagaga tgaccttaa tgcaaccaat acctcctctg atggactca agacagcatt 480
 gggcgttctt taggtgctaa agtcgatagt attcgtttta aagcgcttc taatgtgagt 540
 cagggtgaaa tctatatcga ccgtattatg ttttctgtcg atgatgctcg ctaccaatgg 600
 tctgattatc aagtaaaaac tcgcttatca gaacctgaaa ttcaatttca caacgtaaag 660
 ccacaactac ctgtaacacc tgaaaattta gcggccattg atcttattcg ccaacgtcta 720
 attaatgaat ttgtcggagg tgaaaaagag acaaacctcg cattagaaga gaatatcagc 780
 aaattaaanaa gtgatttcga tgctcttaat actcacactt tagcaaatgg tggaacgcaa 840
 ggcagacatc tgatcactga taaacaaatc attatttatc aaccagagaa tcttaactct 900
 caagataaac aactatttga taattatggt attttaggta attacacgac attaagtgtt 960

10

ES 2 473 610 T3

aatattagcc gtgcttatgt gctggaaaaa gatccccacac aaaaggcgca actaaagcag 1020
atgtacttat taatgacaaa gcatttatta gatcaaggct ttgttaaagg gagtgcttta 1080
gtgacaaccc atcaactggg atacagttct cgttgggtgg atatttccac gttattaatg 1140
tctgatgcac taaaagaagc gaacctacaa actcaagttt atgattcatt actgtgggat 1200
tcacgtgagt ttaaaagtag ttttgatag aaagtaagt ctgatagctc tgatctagat 1260
tatttcaata ccttatctcg ccaacattta gccttattac tactagagcc tgatgatcaa 1320
aagcgtatca acttagttaa tactttcagc cattatatca ctggcgcat aacgcaagt 1380
ccaccgggtg gtaaagatgg tttacgccct gatggtacag catggcgaca tgaaggcaac 1440
tatccgggct actctttccc agcctttaa aatgcctctc agcttattta tttattacgc 1500
gatacaccat tttcagtggg tgaaagtggg tggaaatagcc tgaaaaaagc gatggtttca 1560
gcgtggatct acagtaatcc agaagtggga ttaccgcttg caggaagaca ccctctaac 1620
tcaccttctg taaaatcagt cgctcaaggc tattactggc ttgccatgct tgcaaaatca 1680
tcgcctgata aaacacttgc atctatttat cttgcgatta gtgataaaac acaaaatgaa 1740
tcaactgcta tttttggaga aactattaca ccagcgtctt tacctcaagg tttctatgcc 1800
tttaatggcg gtgcttttgg tattcatcgt tggcaagata aaatggtgac actgaaagct 1860
tataacacca atgtttggct atctgaaatt tataacaaag ataaccgta tggccgttac 1920
caaagtcag gtgtcgctca aatagtgagt aatggctcgc agctttcaca gggctatcag 1980
caagaagggt gggattggaa tagaatgcca ggggcaacca ctatccacct tcctcttaa 2040
gacttagaca gtcctaaacc tcatacctta atgcaacgtg gagagcgtgg atttagcgga 2100
acatcatccc ttgaagggtca atatggcatg atggcattcg atcttattta tcccgccaat 2160
cttgagcgtt ttgatcctaa tttcactgcg aaaaagagtg tattagccgc tgataatcac 2220
ttaattttta ttggtagcaa tataaatagt agtgataaaa ataaaaatgt tgaaacgacc 2280
ttattccaac atgccattac tccaacatta aatacccttt ggattaatgg acaaaaagata 2340
gaaaacatgc cttatcaaac aacacttcaa caaggtgatt ggttaattga tagcaatggc 2400
aatggttact taattactca agcagaaaaa gtaaatgtaa gtcgccaaca tcaggtttca 2460
gcggaaaata aaaatcgcca accgacagaa ggaaacttta gctcggcatg gatcgatcac 2520
agcactcgcc ccaaagatgc cagttatgag tatatggtct ttttagatgc gacacctgaa 2580
aaaatgggag agatggcaca aaaattccgt gaaaataatg ggttatatca ggttcttctg 2640
aaggataaag acgttcatat tattctcgat aaactcagca atgtaacggg atatgccttt 2700
tatcagccag catcaattga agacaaatgg atcaaaaagg ttaataaacc tgcaattgtg 2760
atgactcatc gacaaaaaga cactcttatt gtcagtgcag ttacacctga tttaaatag 2820
actcgccaaa aagcagcaac tcctgtcacc atcaatgtca cgattaatgg caaatggcaa 2880
tctgctgata aaaatagtg agtgaaatag caggtttctg gtgataaacac tgaactgacg 2940
tttacgagtt actttggat tccacaagaa atcaaaactct cgccactccc ttga 2994

<210> 9
 <211> 2994
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Proteus Vulgaris

<400> 9

```

gccaccagca atcctgcatt tgatcctaaa aatctgatgc agtcagaaat ttaccatfff      60
gcacaaaata acccattagc agacttctca tcagataaaa actcaatact aacgttatct      120
gataaacgta gcattatggg aaaccaatct cttttatgga aatggaaagg tggtagtagc      180
ttactttac ataaaaaact gattgtcccc accgataaag aagcatctaa agcatgggga      240
cgctcatcca cccccgtttt ctcattttgg ctttacaatg aaaaaccgat tgatggttat      300
cttactatcg atttcggaga aaaactcatt tcaaccagtg aggctcaggc aggctttaa      360
gtaaaattag atttcactgg ctggcgtact gtgggagtct ctttaaataa cgatcttgaa      420
aatcgagaga tgaccttaa tgcaaccaac acctcctctg atggtactca agacagcatt      480
gggcgttctt taggtgctaa agtcgatagt attcgtttta aagcgccttc taatgtgagt      540
cagggtgaaa tctatatcga ccgtattatg ttttctgtcg atgatgctcg ctaccaatgg      600
tctgattatc aagtaaaaac tcgcttatca gaacctgaaa ttcaatttca caacgtaaag      660
ccacaactac ctgtaacacc tgaaaattta gcggccattg atcttattcg ccaacgtcra      720
attaatgaat ttgtcggagg tgaaaaagag acaaacctcg cattaagaaga gaatatcagc      780
aaattaaaaa gtgatttcga tgctcttaat actcacactt tagcaaatgg tggaaacgcaa      840
ggcagacatc tgatcactga taaacaaatc attatttate aaccagagaa tcttaactct      900
caagataaac aactatttga taattatggt attttaggta attacacgac attaattggt      960
aatattagcc gtgcttatgt gctggaaaaa gatcccacac aaaaggcgca actaaagcag     1020
atgtacttat taatgacaaa gcatttatta gatcaaggct ttgttaaagg gagtgcttta     1080
gtgacaacc atcactgggg atacagttct cgttggtggt atatttcac gttattaatg     1140
tctgatgcac taaaagaagc gaacctaca actcaagttt atgattcatt actgtggtat     1200
tcacgtgagt ttaaaagtag ttttgatatg aaagtaagtg ctgatagctc tgatctagat     1260
tatttcaata cttatctcg ccaacattta gccttattac tactagagcc tgatgatcaa     1320
aagcgtatca acttagttaa tactttcagc cattatatca ctggcgcatt aacgcaagtg     1380
ccaccgggtg gtaaagatgg tttacgccct gatggtacag catggcgaca tgaaggcaac     1440
    
```

10

ES 2 473 610 T3

tatccgggct actctttccc agcctttaaa aatgcctctc agcttattta tttattacgc 1500
gatacaccat tttcagtggg tgaaagtggg tggaatagcc tgaaaaaagc gatggtttca 1560
gcgtggatct acagtaatcc agaagtggga ttaccgcttg caggaagaca ccctcttaac 1620
tcaccttcgt taaaatcagt cgctcaaggc tattactggc ttgccatgtc tgcaaaatca 1680
tcgcctgata aaacacttgc atctatztat cttgctgatta gtgataaaac acaaaatgaa 1740
tcaactgcta tttttggaga aactattaca ccagcgtctt tacctcaagg tttctatgcc 1800
tttaatggcg gtgcttttgg tattcatcgt tggcaagata aaatggtgac actgaaagct 1860
tataacacca atgtttggc atctgaaatt tataacaaag ataaccgta tggccgttac 1920
caaagtcatg gtgtcgtca aatagtgagt aatggctcgc agctttcaca gggctatcag 1980
caagaagggt gggattggaa tagaatgcca ggggcaacca ctatccacct tcctcttaaa 2040
gacttagaca gtcctaaacc tcatacctta atgcaacgtg gagagcgtgg atttagcgga 2100
acatcatccc ttgaaggcca atatggcatg atggcattcg atcttattta tcccgccaat 2160
cttgagcgtt ttgatcctaa tttcactgcg aaaaagagtg tattagccgc tgataatcac 2220
ttaattttta ttggtagcaa tataaatagt agtgataaaa ataaaaatgt tgaaacgacc 2280
ttattccaac atgctattac tccaacatta aatacccttt ggattaatgg acaaaaagata 2340
gaaaacatgc cttatcaaac aacacttcaa caaggtgatt ggtaattga tagcaatggc 2400
aatggttact taattactca agcagaaaaa gtaaattgaa gtcgccaaca tcaggtttca 2460
gcggaataata aaaatcgcca accgacagaa ggaaacttta gctcggcatg gatcgatcac 2520
agcactcgcc ccaagatgc cagttatgag tatatggtct ttttagatgc gacacctgaa 2580
aaaatgggag agatggcaca aaaattccgt gaaaataatg ggttatatca ggttcttcgt 2640
aaggataaag acgttcatat tattctcgat aaactcagca atgtaacggg atatgccttt 2700
tatcagccag catcaattga agacaaatgg atcaaaaagg ttaataaacc tgcaattgtg 2760
atgactcatc gacaaaaaga cactcttatt gtcagtgcag ttacacctga tttaaatag 2820
actcgccaaa aagcagcaac tcctgtcacc atcaatgtca cgattaatgg caaatggcaa 2880
tctgctgata aaaatagtga agtgaaatat caggtttctg gtgataaacac tgaactgacg 2940
tttacgagtt actttggtat tccacaagaa atcaaaactct cgccactccc ttga 2994

<210> 10
<211> 2994
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Proteus Vulgaris

<400> 10
gccaccagca atcctgcatt tgatcctaaa aatctgatgc agtcagaaat ttaccatttt 60

ES 2 473 610 T3

gcacaaaata acccattagc agacttctca tcagataaaa actcaatact aacgttatct 120
gataaacgta gcattatggg aaaccaatct cttttatgga aatggaaagg tggtagtagc 180
ttactttac ataaaaaact gattgtcccc accgataaag aagcatctaa agcatgggga 240
cgctcatcca cccccgtttt ctcatthtgg ctttacaatg aaaaaccgat tgatggttat 300
cttactatcg atttcggaga aaaactcatt tcaaccagtg aggctcaggc aggctttaaa 360
gtaaaattag atttcactgg ctggcgtact gtgggagtct ctttaaataa cgatcttgaa 420
aatcgagaga tgaccttaa tgcaaccaat acctcctctg atggactca agacagcatt 480
gggcgttctt taggtgctaa agtcgatagt attcgthtta aagcgccttc taatgtgagt 540
cagggtgaaa tctatatcga ccgtattatg tttctgtcg atgatgctcg ctaccaatgg 600
tctgattatc aagtaaaaac tcgcttatca gaacctgaaa ttcaatttca caacgtaaag 660
ccacaactac ctgtaacacc tgaaaattta gcggccattg atcttattcg ccaacgtcta 720
attaatgaat ttgtcggagg tgaaaaagag acaaacctcg cattagaaga gaatatcagc 780
aaattaaaa gtgatttcga tgctcttaat actcacactt tagcaaatgg tggaacgcaa 840
ggcagacatc tgatcactga taaacaaatc attatttatc aaccagagaa tcttaactct 900
caagataaac aactatttga taattatgth attttaggta attacacgac attaatgtht 960
aatattagcc gtgcttatgt gctggaaaaa gatcccacac aaaaggcgc aactaaagcag 1020
atgtacttat taatgacaaa gcatttatta gatcaaggct ttgttaaagg gagtgcttta 1080
gtgacaacc atcactgggg atacagttct cgthggthgt atatttccac gttattaatg 1140
tctgatgcac taaaagaagc gaacctacaa actcaagtht atgattcatt actgtggtat 1200
tcacgtgagt ttaaaagtag thttgatatg aaagthaagth ctgatagctc tgatctagat 1260
tatttcaata cttatctcg ccaacattta gccttattac tactagagcc tgatgatcaa 1320
aagcgtatca acttagthaa tactthtcagc cattatatca ctggcgcatt aacgcaagth 1380
ccaccgggtg gtaaagatgg thtacgccct gatggtacag catggcgaca tgaaggcaac 1440
tatccgggtc actctthccc agcctthaaa aatgcctctc agcttattta thtattacgc 1500
gatacaccat thtcagthgg tgaaagthgt tggaatagcc tgaaaaaagc gatgthttca 1560
gcgtggatct acagthaatc agaagthgga thaccgctth caggaagaca cctctthaac 1620
tcacctctg taaaatcagth cgctcaaggc thtactggc thgcatgthc tgcaaaatca 1680
tcgcctgata aaacactthc atctatttht ctthgcgatta gtgataaac acaaaatgaa 1740
tcaactgcta thttthggaga aactattaca ccagcgtctt tacttcaagg thtctatgcc 1800
thtaatggcg gtgctthtgg thttcatcgt thgcaagata aatgthgthc actgaaagct 1860
tataacacca atgthtggth atctgaaatt tataacaaag ataaccgtht thgcccgttac 1920

ES 2 473 610 T3

caaagtcattg gtgtcgtca aatagtgagt aatggctcgc agctttcaca gggctatcag 1980
 caagaagggtt gggattggaa tagaatgcca ggggcaacca ctatccacct tcctcttaaa 2040
 gacttaaaca gtcctaaacc tcatacctta atgcaacgtg gagagcgtgg atttagcggg 2100
 acatcatccc ttgaagggtca atatggcatg atggcattcg atcttattta tcccgccaat 2160
 cttgagcgtt ttgatcctaa tttcactgcg aaaaagagtg tattagccgc tgataatcac 2220
 ttaattttta ttggtagcaa tataaatagt agtgataaaa ataaaaatgt tgaaacgacc 2280
 ttattccaac atgccattac tccaacatta aatacccttt ggattaatgg acaaaagata 2340
 gaaaacatgc cttatcaaac aacacttcaa caaggtgatt ggtaattga tagcaatggc 2400
 aatggttact taattactca agcagaaaaa gtaaattgaa gtcgccaaca tcaggtttca 2460
 gcggaaaata aaaatcgcca accgacagaa ggaaacttta gctcggcatg gatcgatcac 2520
 agcactcgcc ccaaagatgc cagttatgag tatatggtct ttttagatgc gacacctgaa 2580
 aaaatgggag agatggcaca aaaattccgt gaaaataatg ggttatatca ggttcttcgt 2640
 aaggataaag acgttcatat tattctcgat aaactcagca atgtaacggg atatgccttt 2700
 tatcagccag catcaattga agacaaatgg atcaaaaagg ttaataaacc tgcaattgtg 2760
 atgactcatc gacaaaaaga cactcttatt gtcagtgcag ttacacctga tttaaatag 2820
 actcgccaaa aagcagcaac tcctgtcacc atcaatgtca cgattaatgg caaatggcaa 2880
 tctgctgata aaaatagtga agtgaaatat caggtttctg gtgataacac tgaactgacg 2940
 tttacgagtt actttggtat tccacaagaa atcaaactct cgccactccc ttga 2994

<210> 11
 <211> 2994
 <212> ADN
 <213> Proteus vulgaris

5

<400> 11
 gccaccagca atcctgcatt tgatcctaaa aatctgatgc agtcagaaat ttaccatttt 60
 gcacaaaata acccattagc agactttctca tcagataaaa actcaatact aacgttatct 120
 gataaacgta gcattatggg aaaccaatct cttttatgga aatggaaagg tggtagtagc 180
 tttactttac ataaaaaact gattgtcccc accgataaag aagcatctaa agcatgggga 240
 cgctcatcca cccccgtttt ctcatTTTTg ctttacaatg aaaaaccgat tgatggttat 300
 ctactatcg atttcggaga aaaactcatt tcaaccagtg aggctcaggc aggctttaa 360
 gtaaaattag atttcactgg ctggcgact gtgggagtct ctttaaataa cgatcttgaa 420
 aatcgagaga tgaccttaa tgcaaccaat acctcctctg atgggtactca agacagcatt 480
 gggcgttctt taggtgctaa agtcgatagt attcgtttta aagcgccttc taatgtgagt 540
 cagggtgaaa tctatatcga ccgtattatg tttctgtcg atgatgctcg ctaccaatgg 600

10

ES 2 473 610 T3

tctgattatc aagtaaaaaac tcgcttatca gaacctgaaa ttcaatttca caacgtaaag 660
ccacaactac ctgtaacacc tgaaaattta gcggccattg atcttattcg ccaacgtcta 720
attaatgaat ttgtcggagg tgaaaaagag acaaacctcg cattagaaga gaatatcagc 780
aaattaaaaa gtgatttcga tgctcttaat actcacactt tagcaaatgg tggaacgcaa 840
ggcagacatc tgatcactga taaacaaatc attatttatc aaccagagaa tcttaactct 900
caagataaac aactatttga taattatggt attttaggta attacacgac attaatgttt 960
aatattagcc gtgcttatgt gctggaaaaa gatcccacac aaaaggcgca actaaagcag 1020
atgtacttat taatgacaaa gcatttatta gatcaaggct ttgttaaagg gagtgcttta 1080
gtgacaacc atcactgggg atacagttct cgttggtggt atatttccac gttattaatg 1140
tctgatgcac taaaagaagc gaacctaca actcaagttt atgattcatt actgtggtat 1200
tcacgtgagt ttaaaagtag ttttgatatg aaagtaagtg ctgatagctc tgatctagat 1260
tatttcaata ccttatctcg ccaacattta gccttattac tactagagcc tgatgatcaa 1320
aagcgtatca acttagttaa tactttcagc cattatatca ctggcgcat aacgcaagtg 1380
ccaccgggtg gtaaagatgg tttacgccct gatggtacag catggcgaca tgaaggcaac 1440
tatccgggct actctttccc agcctttaa aatgcctctc agcttattta tttattacgc 1500
gatacaccat tttcagtggg tgaaagtggg tggaatagcc tgaaaaaagc gatggtttca 1560
gcgtggatct acagtaatcc agaagttgga ttaccgcttg caggaagaca ccctcttaac 1620
tcacctcgt taaaatcagt cgctcaaggc tattactggc ttgccatgtc tgcaaaatca 1680
tcgcctgata aaacacttgc atctatttat cttgcgatta gtgataaaac acaaaatgaa 1740
tcaactgcta tttttggaga aactattaca ccggcgtctt tacctcaagg tttctatgcc 1800
tttaatggcg gtgcttttgg tattcatcgt tggcaagata aaatggtgac actgaaagct 1860
tataacacca atgtttggtc atctgaaatt tataacaaag ataaccgtta tggccgttac 1920
caaagtcatg gtgtcgtc caaagtgagt aatggctcgc agctttcaca gggctatcaa 1980
caagaagggt gggattggaa tagaatgcca ggggcaacca ctatccacct tccctttaa 2040
gacttagaca gtcctaaacc tcatacccta atgcagcgtg gagagcgtgg atttagcgg 2100
acatcatccc ttgaaggcca atatggcatg atggcattcg atcttattta tcccgccaat 2160
cttgagcgtt ttgatcctaa tttcactgcg aaaaagagtg tattagccgc tgataatcac 2220
ttaattttta ttggtagcaa tataaatagt agtgataaaa ataaaaatgt tgaaacgacc 2280
ttattccaac atgccattac tccaacatta aatacccttt ggattaatgg acaaaagata 2340
gaaaacatgc cttatcaaac aacacttcaa caaggtgatt ggttaattga tagcaatggc 2400
aatggttact taattactca agcagaaaaa gtaaatgtaa gtcgccaaca tcaggtttca 2460
gcggaaaaata aaaatcgcca accgacagaa ggaaacttta gctcggcatg gatcgatcac 2520

ES 2 473 610 T3

agcactcgcc ccaaagatgc cagttatgag tatatggtct ttttagatgc gacacctgaa 2580
 aaaatgggag agatggcaca aaaattccgt gaaaataatg ggttatatca ggttcttcgt 2640
 aaggataaag acgttcatat tattctcgat aaactcagca atgtaacggg atatgccttt 2700
 tatcagccag catcaattga agacaaatgg atcaaaaagg ttaataaacc tgcaattgtg 2760
 atgactcatc gacaaaaaga cactcttatt gtcagtgcag ttacacctga tttaaatatg 2820
 actcgccaaa aagcagcaac tcctgtcacc atcaatgtca cgattaatgg caaatggcaa 2880
 tctgctgata aaaatagtga agtgaaatat cagggttctg gtgataacac tgaactgacg 2940
 tttacgagtt actttggtat tccacaagaa atcaaaactct cgccactccc ttga 2994

<210> 12
 <211> 2994
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Proteus Vulgaris
 <400> 12

5

gccaccagca atcctgcatt tgatcctaaa aatctgatgc agtcagaaat ttaccatttt 60
 gcacaaaata acccattagc agacttctca tcagataaaa actcaatact aacgttatct 120
 gataaacgta gcattatggg aaaccaatct cttttatgga aatggaaagg tggtagtagc 180
 tttactttac ataaaaaact gattgtcccc accgataaag aagcatctaa agcatgggga 240
 cgctcatcca cccccgtttt ctcatittgg ctttacaatg aaaaaccgat tgatggttat 300
 cttactatcg atttcggaga aaaactcatt tcaaccagtg aggctcaggc aggctttaa 360
 gtaaaattag atttcactgg ctggcgact gtgggagtct ctttaataa cgatcttgaa 420
 aatcgagaga tgaccttaa tgcaaccaat acctcctctg atggtactca agacagcatt 480
 ggacgttctt taggtgctaa agtcgatagt attcgtttta aagcgccttc taatgtgagt 540
 cagggtgaaa tctatatcga ccgtattatg ttttctgtcg atgatgctcg ctaccaatgg 600
 tctgattatc aagtaaaaac tcgcttatca gaacctgaaa ttcaatttca caacgtaaag 660
 ccacaactac ctgtaacacc tgaaaattta gcggccattg atcttattcg ccaacgtcta 720
 attaatgaat ttgtcggagg tgaaaaagag acaaacctcg cattagaaga gaatatcagc 780
 aaattaaaaa gtgatttcga tgctcttaat actcacactt tagcaaatgg tggaacgcaa 840
 ggcagacatc tgatcactga taaacaaatc attatttatc aaccagagaa tcttaactct 900
 caagataaac aactatttga taattatggt attttaggta attacacgac attaatgttt 960
 aatattagcc gtgcttatgt gctggaaaaa gatcccacac aaaaggcgca actaaagcag 1020
 atgtacttat taatgacaaa gcatttatta gatcaaggct ttgttaaagg gagtgcttta 1080

10

ES 2 473 610 T3

gtgacaaccc atcactgggg atacagttcc cgttgggtgg atatttccac gttattaatg 1140
tctgatgcac taaaagaagc gaacctacaa actcaagttt atgattcatt actgtgggat 1200
tcacgtgagt ttaaaagtag ttttgatatg aaagtaagtg ctgatagctc tgatctagat 1260
tatttcaata ctttatctcg ccaacattta gccttattac tactagagcc tgatgatcaa 1320
aagcgtatca acttagttaa tactttcagc cattatatca ctggcgatt aacgcaagtg 1380
ccaccgggtg gtaaagatgg tttacgccct gatggtacag catggcgaca tgaaggcaac 1440
tatccgggct actctttccc agcctttaa aatgcctctc agcttattta tttattacgc 1500
gatacaccat tttcagtggtg tgaagtggt tggaaatagcc tgaaaaaagc gatggtttca 1560
gcggtggatct acagtaatcc agaagttgga ttaccgcttg caggaagaca ccctcttaac 1620
tcaccttcgt taaaatcagt cgctcaaggc tattactggc ttgccatgtc tgcaaaatca 1680
tcgcctgata aaacacttgc atctatttat cttgcgatta gtgataaaac acaaaatgaa 1740
tcaactgcta tttttggaga aactattaca ccagcgtctt tacctcaagg tttctatgcc 1800
tttaatggcg gtgcttttgg cattcatcgt tggcaagata aaatggtgac actgaaagct 1860
tataacacca atgtttggtc atctgaaatt tataacaaag ataaccgta tggccgttac 1920
caaagtcatg gtgtcgtca aatagtgagt aatggctcgc agctttcaca gggctatcag 1980
caagaagggt gggattggaa tagaatgcca ggggcaacca ctatccacct tcctcttaaa 2040
gacttagaca gtcctaaacc tcatacctta atgcaacgtg gagagcgtgg atttagcggg 2100
acatcatccc ttgaaggtca atatggcatg atggcattcg atcttattta tcccgccaat 2160
cttgagcgtt ttgatcctaa tttcactgcg aaaaagagtg tattagccgc tgataatcac 2220
ttaattttta ttggtagcaa tataaatagt agtgataaaa ataaaaatgt tgaaacgacc 2280
ttattccaac atgccattac tccaacatta aatacccttt ggattaatgg acaaaagata 2340
gaaaacatgc cttatcaaac aacacttcaa caaggtgatt ggtaattga tagcaatggc 2400
aatggttact taattactca agcagaaaaa gtaaagttaa gtcgccaaca tcaggtttca 2460
gcggaataata aaaatcgcca accgacagaa ggaaacttta gctcggcatg gatcgarcac 2520
agcactcgcc ccaaagatgc cagttatgag tatatggtct ttttagatgc gacacctgaa 2580
aaaatgggag agatggcaca aaaattccgt gaaaataatg ggttatatca gttcttcgt 2640
aaggataaag acgttcatat tattctcgat aaactcagca atgtaacggg atatgccttt 2700
tatcagccag catcaattga agacaaatgg atcaaaaagg ttaataaacc tgcaattgtg 2760
atgactcatc gacaaaaaga cactcttatt gtcagtgcag ttacacctga tttaaatag 2820
actcgccaaa aagcagcaac tcctgtcacc atcaatgtca cgattaatgg caaatggcaa 2880
tctgctgata aaaatagtgag agtgaaatat caggtttctg gtgataacac tgaactgacg 2940
tttacgagtt actttggtat tccacaagaa atcaaaactct cgccactccc ttga 2994

<210> 13
<211> 2992
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Proteus Vulgaris

<400> 13

gccaccagca atcctgcatt tgatcctaaa aatctgatgc agtcagaaat ttaccat	60
gcacaaaata acccattagc agacttctca tcagataaaa actcaatact aacg	120
gataaacgta gcattatggg aaaccaatct cttttatgga aatggaaagg tg	180
ttactttac ataaaaaact gattgtcccc accgataaag aagcatctaa ag	240
cgctcatcca cccccgtttt ctcattttgg ctttacaatg aaaaaccgat tg	300
cttactatcg atttcggaga aaaactcatt tcaaccagtg aggctcaggc ag	360
gtaaaattag atttcactgg ctggcgtact gtgggagtct ctttaaataa cg	420
aatcgagaga tgacctaaa tgcaaccaat acctcctctg atggtactca ag	480
gggcgttctt taggtgctaa agtcgatagt attcgtttta aagcgccttc ta	540
cagggtgaaa tctatatcga ccgtattatg ttttctgtcg atgatgctcg ct	600
tctgattatc aagtaaaaac tcgcttatca gaacctgaaa ttcaatttca ca	660
ccacaactac ctgtaacacc tgaaaattta gcggccattg atcttattcg cc	720
attaatgaat ttgtcggagg tgaaaaagag acaaacctcg cattagaaga ga	780
aaattaaaaa gtgatttcga tgctcttaat actcacactt tagcaaatgg tg	840
ggcagacatc tgatcactga taaacaaatc attatttatc aaccagagaa tc	900
caagataaac aactatttga taattatggt attttaggta attacacgac at	960
aatattagcc gtgcttatgt gctggaaaaa gatccccacac aaaaggcgca ac	1020
atgtacttat taatgacaaa gcatttatta gatcaaggct ttgttaaagg gag	1080
gtgacaacc atcactgggg atacagttct cgttgggtgg atatttccac gtt	1140
tctgatgcac taaaagaagc gaacctaca actcaagttt atgattcatt act	1200
tcacgtgagt ttaaaagtag ttttgatag aaagtaagtg ctgatagctc tg	1260
tatttcaata ccttatctcg ccaacattta gccttattac tactagagcc tg	1320
aagcgtatca acttagttaa tactttcagc cattatatca ctggcgcatt a	1380
ccaccgggtg gtaaagatgg tttacgccct gatggtacag catggcgaca tg	1440
tatccgggct actctttccc agcctttaa aatgcctctc agcttattta tt	1500
gatacaccat tttcagtggg tgaaagtggg tggaatagcc tgaaaaaagc ga	1560

ES 2 473 610 T3

gcgtggatct acagtaatcc agaagttgga ttaccgcttg caggaagaca ccctcttaac 1620
 tcaccttcgt taaaatcagt cgctcaaggc tattactggc ttgccatgtc tgcaaatca 1680
 tcgcctgata aaacacttgc atctatttat cttgcgatta gtgataaaac acaaaatgaa 1740
 tcaactgcta tttttggaga aactattaca ccagcgcttt tacctcaagg tttctatgcc 1800
 tttaatggcg gtgcttttgg tattcatcgt tggcaagata aaatggtgac actgaaagct 1860
 tataacacca atgtttggtc atctgaaatt tataacaaag ataaccgtta tggccgttac 1920
 caaagtcatg gtgtcgctca aatagtgagt aatggctcgc agctttcaca gggctatcag 1980
 caagaaggtt gggattggaa tagaatgcca ggggcaacca ctatccacct tcctcttaaa 2040
 gacttagaca gtctaaacc tcatacctta atgcaacgtg gagagcgtgg atttagcggg 2100
 acatcatccc ttgaaggcca atatggcatg atggcattcg atcttattta tcccgccaat 2160
 cttgagcgtt ttgatcctaa tttcactgcg aaaaagagtg tattaccgct gataatcact 2220
 taatTTTTAT tggtagcaat ataaatagta gtgataaaaa taaaatggt gaaacgacct 2280
 tattccaaca tgccattact ccaacattaa ataccctttg gattaatgga caaaagatag 2340
 aaaacatgcc ttatcaaaca acacttcaac aagggtgattg gttaattgat agcaatggca 2400
 atggttactt aattactcaa gcagaaaaag taaatgtaag tcgccaacat caggtttcag 2460
 cggaaaataa aaatcgccaa ccgacagaag gaaactttag ctcggcatgg atcgatcaca 2520
 gcactcggcc caaagatgcc agttatgagt atatggcttt tttagatgcg acacctgaaa 2580
 aaatgggaga gatggcacia aaattccgtg aaaataatgg gttatatcag gttcttcgta 2640
 aggataaaga cgttcatatt attctcgata aactcagcaa tgtaacggga tatgcctttt 2700
 atcagccagc atcaattgaa gacaaatgga tcaaaaaggt taataaacct gcattgtgat 2760
 gactcatcga caaaaagaca ctcttattgt cagtgcagtt acacctgatt taaatatgac 2820
 tcgccaataa gcagcaactc ctgtcaccat caatgtcacg attaatggca aatggcaatc 2880
 tgctgataaa aatagtgaa gaaatatca ggtttctggt gataacactg aactgacggt 2940
 tacgagttac tttggtattc cacaagaaat caaactctcg ccactccctt ga 2992

<210> 14
 <211> 2993
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Proteus Vulgaris

10

<400> 14

gccaccagca atcctgcatt tgatcctaaa aatctgatgc agtcagaaat ttaccatttt 60
 gcacaaaata acccattagc agactttctca tcagataaaa actcaatact aacgttatct 120
 gataaacgta gcattatggg aaaccaatct ctttatgga aatggaaagg tggtagtagc 180

ES 2 473 610 T3

tttactttac ataaaaaact gattgtcccc accgataaag aagcatctaa agcatgggga	240
cgctcatcca cccccgtttt ctcatthttg ctttacaatg aaaaaccgat tgatggttat	300
cttactatcg atttcggaga aaaactcatt tcaaccagtg aggctcaggc aggctttaa	360
gtaaaattag atttcactgg ctggcgtact gtgggagtct ctttaaataa cgatcttgaa	420
aatcgagaga tgaccttaa tgcaaccaat acctcctctg atggtactca agacagcatt	480
gggcgttcct taggtgctaa agtcgatagt attcgthttta aagcgccttc taatgtgagt	540
cagggtgaaa tctatatcga ccgtattatg ttttctgtcg atgatgctcg ctaccaatgg	600
tctgattatc aagtaaaaac tcgcttatca gaacctgaaa ttcaatttca caacgtaaag	660
ccacaactac ctgtaacacc tgaaaattta gcggccattg atcttattcg ccaacgtcta	720
attaatgaat ttgtcggagg tgaaaaagag acaaacctcg cattagaaga gaatatcagc	780
aaattaaaaa gtgatttcga tgctcttaat actcacactt tagcaaatgg tggaacgcaa	840
ggcagacatc tgatcactga taaacaaatc attatthtct aaccagagaa tcttaactct	900
caagataaac aactatthga taattatgth atthtaggta attacacgac attaathgth	960
aatathagcc gtgcttatgt gctgaaaaag atccccacaca aaaggcgcaa ctaaagcaga	1020
tgtactthatt aatgacaaaag catthattag atcaaggctt tgthaaaggg agtgctthag	1080
tgacaaccca tcactgggga tacagthctc gthggtggtat thttccacg ththaatgt	1140
ctgatgcact aaaagaagcg aacctacaaa ctcaagthta tgathcatta ctgthgthatt	1200
cacgthgagth taaaagthagth ththgatthga aagthagthc thgatgctct gatctagath	1260
atthcaatac ctthctctcg caacaththag ctththact actagagcct gatgatcaaa	1320
agcgtatcaa ctthagthaat actthcagcc atthathcac thgthcatta acgcaagthc	1380
caccgggthg taaagathgth thacgthctg atgthtacagc atgthcagat gaagthcaact	1440
atccgggcta ctctthccca gcctthaaaa atgthctctca gctththth thththacgth	1500
atacaccatt thcagthgthg gaaagthgth ggaathagcct gaaaaagcg atgththcag	1560
cgtgthctta cagthaatcca gaagthgthg thcagctthg aggaagacac ctctthaaact	1620
cacctthgth aaaaacagth gthcaagthg atthctgthg thcctatgth gcaaaatcat	1680
cgctgataa aacactthgca ththththct ththgththg thgataaaaca caaaatgaat	1740
caactgctat thththgagaa actththacac cagcgtctth acctcaagth thctatgct	1800
thaatggcgg thctththgth atthctctgth gthcaagataa aatgthgthca ctgaaagct	1860
ataacaccaa thththgthca ththgaaathh athacaagaa thaacgthth ggccgththacc	1920
aaagthcatg ththctctcaa aththgthgth atgthctgca gctthcagag gthctatcagc	1980
agaagththg gthathgthaat agaatgthcag gthcaaccac ththcctth cctctthaaag	2040

ES 2 473 610 T3

acttagacag	tcctaaacct	cataccttaa	tgcaacgtgg	agagcgtgga	tttagcggaa	2100
catcatccct	tgaaggtaa	tatggcatga	tggcattcga	tcttatttat	cccgccaatc	2160
ttgagcgttt	tgatccta	ttcactgcga	aaaagagtgt	attagccgct	gataatcact	2220
taatttttat	tggtagcaat	ataaatagta	gtgataaaaa	taaaaatggt	gaaacgacct	2280
tattccaaca	tgccattact	ccaacattaa	ataccctttg	gattaatgga	caaaagatag	2340
aaaacatgcc	ttatcaaa	acacttcaac	aaggtgattg	gttaattgat	agcaatggca	2400
atggttactt	aattactcaa	gcagaaaaag	taaatgtaag	tcgccaacat	caggtttcag	2460
cggaaaataa	aaatcgccaa	ccgacagaag	gaaactttag	ctcggcatgg	atcgatcaca	2520
gcactcgccc	caaagatgcc	agttatgagt	atatggtctt	tttagatgcg	acacctgaaa	2580
aaatgggaga	gatggcacia	aaattccgtg	aaaataatgg	gttatatcag	gttcttcgta	2640
aggataaaga	cgttcatatt	attctcgata	aactcagcaa	tgtaacggga	tatgcctttt	2700
atcagccagc	atcaattgaa	gacaaatgga	tcaaaaaggt	taataaacct	gcaattgtga	2760
tgactcatcg	acaaaaagac	actcttattg	tcagtgcagt	tacacctgat	ttaaatatga	2820
ctcgccaaaa	agcagcaact	cctgtcacca	tcaatgtcac	gattaatggc	aaatggcaat	2880
ctgctgataa	aaatagttaa	gtgaaatata	aggtttctgg	tgataacact	gaactgacgt	2940
ttacgagtta	ctttggtatt	ccacaagaaa	tcaaactctc	gccactccct	tga	2993

REIVINDICACIONES

1. Una enzima mutante condroitinasa ABCI elegida entre SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6.
2. La enzima condroitinasa ABCI mutante según la reivindicación 1ª, en donde dicha enzima es la SEC ID No. 1.
3. La enzima condroitinasa ABCI mutante según la reivindicación 1ª, en donde dicha enzima es la SEC ID N°: 2.
- 5 4. La enzima condroitinasa ABCI mutante según la reivindicación 1ª, en donde dicha enzima es la SEC ID N°: 5.
5. La enzima condroitinasa ABCI mutante según la reivindicación 1ª, en donde dicha enzima es la SEC ID N°: 6.
6. La enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª para tratar una lesión del sistema nervioso central o para promover la extensión neuronal.
- 10 7. La enzima según la reivindicación 6ª, en donde la enzima condroitinasa ABCI mutante es para la administración después de una lesión del sistema nervioso central por contusión.
8. La enzima según la reivindicación 6ª, en donde la enzima condroitinasa ABCI mutante es para la administración después de una lesión del sistema nervioso central no causada por contusión.
9. La enzima según la reivindicación 6ª, en donde la enzima condroitinasa ABCI mutante es para la administración después de una lesión de la médula espinal.
- 15 10. La enzima según la reivindicación 6ª, en donde la enzima condroitinasa ABCI mutante es para la administración local, preferiblemente en donde la administración local se elige entre la administración intratecal y la administración tópica.
11. La enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, para facilitar la difusión de un agente en el sistema nervioso central o para potenciar la absorción de un agente en el sistema nervioso central.
- 20 12. La enzima según la reivindicación 11ª, en donde el agente se elige entre el grupo que consiste en materiales biológicos complejos, moléculas pequeñas y células trasplantadas.
13. Una composición farmacéutica que comprende la enzima según la reivindicación 11ª, en combinación con uno o más vehículos aceptables farmacéuticamente, preferiblemente en donde el vehículo farmacéutico se elige entre el grupo que consiste en diluyentes, aglutinantes, lubricantes, agentes colorantes, agentes disgregantes, agentes tampón, agentes isotonzantes, polioles, agentes conservantes y anestésicos.
- 25 14. La enzima según la reivindicación 1ª para inhibir la extravasación de células desde los vasos sanguíneos o para tratar la inflamación en un paciente.
15. La enzima según la reivindicación 14ª para inhibir la extravasación de células desde los vasos sanguíneos, en donde las células se eligen entre el grupo que consiste en glóbulos blancos, leucocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, células B, células T, monocitos y macrófagos.
- 30 16. Un método para modificar las células sanguíneas *ex vivo* que comprende someter las células extraídas de la corriente sanguínea de un paciente a una enzima según la reivindicación 1ª.

Figura 1

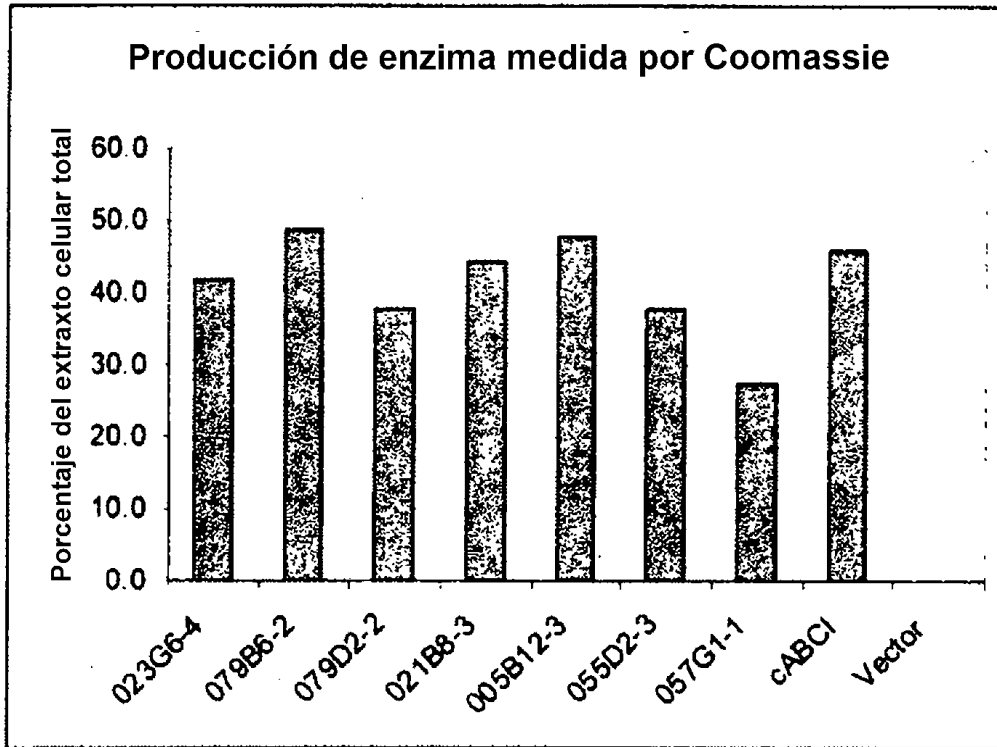


Figura 2

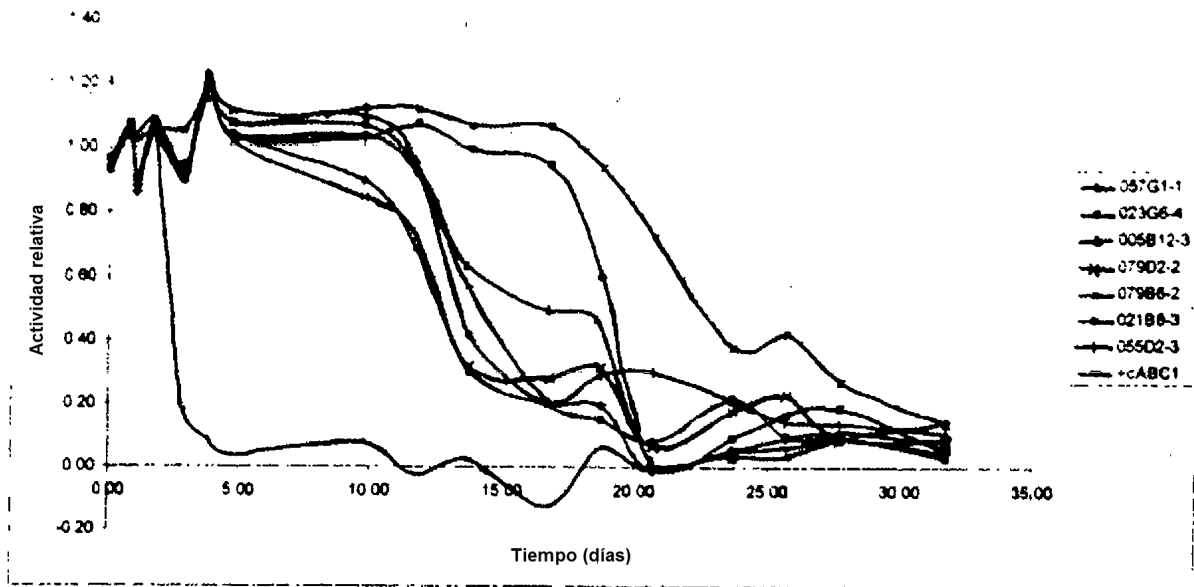


Figura 3

Estabilidad de variantes de condroitinasa ABCI a 37°C a lo largo del tiempo

