



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 425**

51 Int. Cl.:
A01K 67/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00932348 .6**
86 Fecha de presentación : **12.05.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1194033**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.04.2002**

54 Título: **Antitrombina III producida genéticamente y formas mutantes de la misma.**

30 Prioridad: **13.05.1999 US 134174 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

73 Titular/es: **GTC Biotherapeutics, Inc.**
175 Crossing Boulevard
Framingham, Massachusetts 01702, US

72 Inventor/es: **Meade, Harry y**
Bourdon, Paul, R.

74 Agente: **Torner Lasalle, Nuria**

ES 2 299 425 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

Antitrombina III producida genéticamente y formas mutantes de la misma.

5 Antecedentes de la invención

Se está desarrollando un número creciente de proteínas recombinantes para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico; sin embargo, muchas de estas proteínas pueden ser difíciles o caras de producir de una forma funcional en las cantidades requeridas usando métodos convencionales. Los métodos convencionales implican insertar el gen responsable de la producción de una proteína particular en células huésped tales como bacterias, levaduras o células de mamífero, y luego hacer crecer las células en medios de cultivo. Entonces, las células en cultivo sintetizan la proteína deseada. Los sistemas de bacterias o levaduras tradicionales pueden ser incapaces de producir muchas proteínas complejas de una forma funcional. Aunque las células de mamífero pueden reproducir proteínas complejas, generalmente su crecimiento es difícil y caro y producen sólo cantidades de proteína de mg/l.

La aplicación de la tecnología transgénica a la producción comercial de proteínas recombinantes en la leche de animales transgénicos ofrece ventajas significativas sobre los métodos tradicionales de producción de proteínas. Estas ventajas incluyen una reducción en la cantidad total de gastos de capital requeridos, eliminación de la necesidad de compromisos de capital para construir instalaciones inicialmente en el ciclo de vida de desarrollo del producto y coste de producción directo inferior por unidad de proteínas complejas. Es de importancia clave la posibilidad de que, para ciertas proteínas complejas, la producción transgénica puede representar el único método tecnológica y económicamente viable de producción comercial.

En su estado activo, la antitrombina III (ATIII) es un inhibidor de serina proteasa que inhibe la trombina y las formas activadas de los factores X, VII, IX, XI y XII. Normalmente, está presente en el suero a niveles de 14-20 mg/l. Pueden encontrarse niveles disminuidos de ATIII en el suero de individuos que tienen o bien una deficiencia hereditaria de ATIII o bien una deficiencia adquirida, que puede resultar de varios estados patológicos. El tratamiento convencional para la deficiencia hereditaria de ATIII es la terapia sustitutiva con proteínas, que también puede ser eficaz en el tratamiento de algunas deficiencias adquiridas.

Los métodos actuales de obtención de ATIII implican aislar el inhibidor de proteasa a partir de plasma sanguíneo. Sin embargo, el uso de ATIII basada en el plasma presenta diversos problemas debido a los muchos componentes del plasma, incluyendo: variación entre lotes; problemas de inmunogenicidad; y riesgos biológicos peligrosos debidos a contaminación viral.

El documento WO 96/26268 describe la producción de antitrombina III humana de tipo natural en la leche de animales transgénicos. Edmund T *et al*, Blood Vol. 91 n° 12 páginas 4561 a 4571 describen el análisis estructural y funcional de la antitrombina humana producida transgénicamente.

Se describen diversas formas de antitrombina III mutante en la bibliografía, incluyendo Beauchamp N J *et al*, Blood, Vol. 92, n° 8, páginas 2696 a 2708, que describe una mutación T85M/K; Perry J *et al*, Blood, Coagulation and Fibrinolysis, vol. 6, n° 1, 1995 páginas 51 a 54, que describe mutaciones Asn187Asp o Asn187Lys; Bruce D *et al*, Journal of Clinical Investigation, vol. 94, n° 6, páginas 2265-2274, que describe las consecuencias de la mutación Asn187Asp; y Sakuragawa N *et al*, Japanese Journal of Clinical Pathology, vol. 41, n° 5, páginas 492 a 505, que describe mutantes por delección en el extremo C-terminal de la antitrombina III. Sin embargo, todas estas publicaciones describen mutaciones que se producen de manera natural, y no sugieren que tales mutantes puedan ser útiles como medicamentos.

Sumario de la invención

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que pueden producirse transgénicamente formas mutantes de la antitrombina III (ATIII). En su estado activo, la ATIII es un inhibidor de serina proteasa que inhibe la trombina así como otras serina proteasas de la cascada. Tras cambiar su conformación desde el estado tensionado o activo hasta un estado latente o escindido, la ATIII también puede inhibir la angiogénesis. Se descubrió que diversos mutantes que facilitan la actividad anticoagulante y/o antiangiogénica de la ATIII pueden producirse transgénicamente. Por tanto, la invención se refiere en general a antitrombina III humana producida transgénicamente (ATIII_{tg}).

Específicamente, la invención se refiere a antitrombina III humana mutada producida transgénicamente (ATIII_{tg_{mut}}) que tiene actividad antiangiogénica, en la que el bucle reactivo de la ATIII no es reactivo, para su uso como medicamento. Otras realizaciones se refieren a métodos de producción de tal ATIII transgénica en la leche de un animal transgénico. La antitrombina III mutante tiene un bucle reactivo no reactivo, por ejemplo, el bucle activo está plegado (por ejemplo, el bucle reactivo está plegado en la lámina beta) o el bucle reactivo está parcial o completamente eliminado.

En una realización preferida, la ATIII se muta alterando al menos una alfa hélice que subyace a la lámina beta, por ejemplo, mediante inserción, delección o una sustitución de al menos un nucleótido de la secuencia que codifica para una alfa hélice de la ATIII, por ejemplo, ATIII humana. La alfa hélice puede mutarse, por ejemplo, mediante uno o más de: cambio de treonina en la posición 85 por metionina; cambio de treonina en la posición 85 por lisina; y cambio de

ES 2 299 425 T3

asparagina en la posición 187 por un ácido aspártico. En una realización preferida, la mutación altera el bucle reactivo, por ejemplo, desestabilizando la lámina beta dejando que la hebra beta del bucle reactivo se pliegue hacia abajo entre la tercera/cuarta y la quinta/sexta hebras de la lámina beta. En una realización preferida, una ATIII_{gmut} con hélice alfa alterada forma la forma latente de la ATIII más fácilmente que la ATIII de tipo natural, por ejemplo, mediante conversión espontánea y/o a temperaturas inferiores.

En una realización preferida, la ATIII se muta eliminando una posición o todo el extremo C-terminal de la ATIII. En una realización preferida, se elimina el extremo C-terminal en aproximadamente los aminoácidos 70, 60, 50 o menos desde el extremo C-terminal. Preferiblemente, se elimina el extremo C-terminal en: el sitio de elastasa (por ejemplo, aproximadamente 43 aminoácidos desde el extremo C-terminal); o, el sitio de escisión de la trombina (por ejemplo, aproximadamente 39 aminoácidos desde el extremo C-terminal). En una realización preferida, la ATIII mutada en el extremo C-terminal altera el bucle reactivo, por ejemplo, dejando que la hebra beta del bucle reactivo se pliegue en la lámina beta. En una realización preferida, la ATIII mutada en el extremo C-terminal se secreta de un animal transgénico en forma activa.

La ATIII puede mutarse eliminando al menos uno, dos, tres, cuatro sitio(s) de glicosilación. El término “desglicosilado” tal como se usa en el presente documento se refiere a un mutante de ATIII en el que al menos uno, algunos o todos los sitios de glicosilación están eliminados. El mutante de ATIII desglicosilado puede comprender una asparagina en la posición 135 a la que le sigue una serina en la tercera posición. En otra realización, la asparagina en la posición 135 se cambia por una glutamina. En una realización, pueden eliminarse dos, tres, cuatro de los sitios de glicosilación, por ejemplo, se sustituye la asparagina por una glutamina. En una realización, el mutante de ATIII desglicosilado tiene una o más de las siguientes actividades: interactúa, por ejemplo, se une a la heparina más fuertemente que la ATIII de tipo natural; interactúa, por ejemplo, se une a sulfatos de heparina sobre la superficie de células endoteliales; inhibe o reduce la actividad procoagulante; aumenta la semivida de la ATIII mutada, por ejemplo, en comparación con la ATIII de tipo natural.

En una realización, la ATIII se muta disminuyendo la unión a heparina, por ejemplo, mutando uno o más aminoácido(s) fuera del dominio de unión a pentasacáridos, por ejemplo, mediante inserción, delección o sustitución. En una realización, la ATIII se muta sustituyendo uno o más aminoácidos fuera del dominio de unión a pentasacáridos, por ejemplo cambiando la lisina en la posición 114 por una glutamina. En una realización, la forma mutada de unión a heparina de la ATIII reduce sustancialmente la unión a heparina. En una realización, el mutante de unión a heparina de la ATIII tiene actividad inhibidora comparable a la actividad inhibidora de la ATIII de tipo natural, pero no se acelera en presencia de heparina.

La ATIII_{gmut} producida transgénicamente puede producirse en un organismo transgénico, es decir, una planta o un animal transgénico. Los animales transgénicos preferidos incluyen: mamíferos; aves; reptiles; y anfibios. Los mamíferos adecuados incluyen: rumiantes; ungulados; mamíferos domesticados; y animales lecheros. Los animales particularmente preferidos incluyen: cabras, ovejas, camellos, vacas, cerdos, caballos, bueyes, conejos y llamas. Las aves adecuadas incluyen pollos, gansos y pavos. Cuando la proteína transgénica se secreta en la leche de un animal transgénico, el animal debe poder producir al menos 1, y más preferiblemente al menos 10 ó 100 litros de leche al año.

En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} producida transgénicamente se prepara en una glándula mamaria del mamífero transgénico, por ejemplo, un rumiante, por ejemplo, una cabra.

En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} producida transgénicamente se secreta en la leche del mamífero transgénico, por ejemplo, un rumiante, por ejemplo, una cabra.

En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} producida transgénicamente se prepara bajo el control de un promotor específico de glándula mamaria, por ejemplo un promotor específico de la leche, por ejemplo un promotor de caseína o de proteína del suero de la leche. El promotor específico de la leche puede ser un promotor de caseína, promotor de beta lactoglobulina, promotor de proteína ácida del suero de la leche o promotor de lactoalbúmina.

En algunas realizaciones, la ATIII_{gmut} se prepara bajo el control de un promotor específico de vejiga o huevo, y la ATIII_{gmut} se secreta en la orina o en un huevo.

La ATIII_{gmut} es una mutación de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos de la ATIII humana.

En realizaciones preferidas, la preparación incluye al menos 0,1, 1, 10 ó 100 miligramos de ATIII_{gmut}. En realizaciones preferidas, la preparación incluye al menos 0,1, 1, 10 ó 100 gramos de ATIII_{gmut}.

En realizaciones preferidas, la preparación incluye al menos 1, 10, 100 ó 500 miligramos por mililitro de ATIII_{gmut}.

Se describe también una molécula de ácido nucleico aislada que incluye una secuencia que codifica para la proteína ATIII_{gmut} operativamente unida a un promotor específico de tejido, por ejemplo, una secuencia promotora específica de glándula mamaria que da como resultado la secreción de la proteína en la leche de un mamífero transgénico. La ATIII_{gmut} puede ser, por ejemplo, una ATIII_{gmut} descrita en el presente documento.

ES 2 299 425 T3

En realizaciones preferidas, el promotor es un promotor específico de la leche, por ejemplo un promotor de caseína o de proteína del suero de la leche. El promotor específico de la leche puede ser un promotor de caseína, promotor de beta lactoglobulina, promotor de proteína ácida del suero de la leche o promotor de lactoalbúmina.

5 En realizaciones preferidas, el promotor es un promotor específico de vejiga o huevo y la ATIII_{gmut} se secreta en la orina o en un huevo.

Se describe también un método de preparación de ATIII_{gmut} transgénica o una preparación de ATIII_{gmut} transgénica descrita en el presente documento. El método incluye:

10 proporcionar un organismo transgénico, es decir, una planta o un animal transgénico, que incluye un transgén que dirige la expresión de ATIII_{gmut};

15 dejar que se exprese el transgén; y recuperar la ATIII_{gmut} producida transgénicamente o una preparación de la ATIII_{gmut} producida transgénicamente del organismo o de un producto producido por el organismo, por ejemplo, leche, semillas, pelo, sangre, huevos u orina.

En realizaciones preferidas, el método incluye además:

20 insertar un ácido nucleico que dirige la expresión de la ATIII_{gmut} en una célula y dejar que la célula dé lugar a un organismo transgénico.

La ATIII_{gmut} puede ser, por ejemplo, cualquier ATIII_{gmut} descrita en el presente documento.

25 Los animales transgénicos preferidos incluyen: mamíferos; aves; reptiles; y anfibios. Los mamíferos adecuados incluyen: rumiantes; ungulados; mamíferos domesticados; y animales lecheros. Los animales particularmente preferidos incluyen: cabras, ovejas, camellos, vacas, cerdos, caballos, bueyes, conejos y llamas. Las aves adecuadas incluyen pollos, gansos y pavos. Cuando la proteína transgénica se secreta en la leche de un animal transgénico, el animal debe poder producir al menos 1, y más preferiblemente al menos 10 ó 100 litros de leche al año.

30 En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} producida transgénicamente se prepara en una glándula mamaria del mamífero transgénico, por ejemplo, un rumiante, por ejemplo, una cabra.

35 En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} producida transgénicamente se secreta en la leche del mamífero transgénico, por ejemplo, un rumiante, por ejemplo, una cabra.

40 En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} producida transgénicamente se prepara bajo el control de un promotor específico de glándula mamaria, por ejemplo un promotor específico de la leche, por ejemplo un promotor de caseína o de proteína del suero de la leche. El promotor específico de la leche puede ser un promotor de caseína, promotor de beta lactoglobulina, promotor de proteína ácida del suero o promotor de lactoalbúmina.

En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} se prepara bajo el control de un promotor específico de vejiga o huevo, y la ATIII_{gmut} se secreta en la orina o en un huevo.

45 En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} es una mutación de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos de la ATIII de un mamífero o primate, preferiblemente de ser humano.

En realizaciones preferidas, la preparación incluye al menos 1, 10 ó 100 miligramos de ATIII_{gmut}. En realizaciones preferidas, la preparación incluye al menos 1, 10 ó 100 gramos de ATIII_{gmut}.

50 En realizaciones preferidas, la preparación incluye al menos 1, 10, 100 ó 500 miligramos por mililitro de ATIII_{gmut}.

Se describe también un método para proporcionar una preparación transgénica que incluye ATIII_{gmut} en la leche de un mamífero transgénico que incluye:

55 obtener leche de un mamífero transgénico en el que se ha introducido en su línea germinal una secuencia que codifica para la proteína ATIII_{gmut} operativamente unida a una secuencia promotora que da como resultado la expresión de la secuencia que codifica para la proteína en las células epiteliales de la glándula mamaria, secretando de ese modo la ATIII_{gmut} en la leche del mamífero para proporcionar la preparación.

60 La ATIII_{gmut} puede ser, por ejemplo, cualquier ATIII_{gmut} descrita en el presente documento.

65 Los mamíferos adecuados incluyen: rumiantes; ungulados; mamíferos domesticados; y animales lecheros. Los mamíferos particularmente preferidos incluyen: cabras, ovejas, camellos, vacas, cerdos, caballos, bueyes, conejos y llamas. El mamífero transgénico debe poder producir al menos 0,1, 1, y más preferiblemente al menos 10 ó 100 litros de leche al año.

ES 2 299 425 T3

En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} producida transgénicamente se prepara en una glándula mamaria del mamífero transgénico, por ejemplo, un rumiante, por ejemplo, una cabra.

5 En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} producida transgénicamente se secreta en la leche del mamífero transgénico, por ejemplo, un rumiante, por ejemplo, una cabra.

En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} producida transgénicamente se prepara bajo el control de un promotor específico de glándula mamaria, por ejemplo un promotor específico de la leche, por ejemplo un promotor de caseína o de proteína del suero de la leche. El promotor específico de la leche puede ser un promotor de caseína, promotor de beta lactoglobulina, promotor de proteína ácida del suero de la leche o promotor de lactoalbúmina.

En realizaciones preferidas, la leche incluye al menos 1, 10, 100, 500, 1.000 ó 2.000 miligramos por mililitro de ATIII_{gmut}.

15 Se describe también un organismo transgénico, que expresa una ATIII_{gmut} transgénica, preferiblemente una ATIII_{gmut} derivada de la ATIII humana, y a partir de la cual puede obtenerse una preparación transgénica de ATIII_{gmut}.

La ATIII_{gmut} puede ser, por ejemplo, cualquier ATIII_{gmut} descrita en el presente documento.

20 El organismo transgénico es una planta o animal transgénico. Los animales transgénicos preferidos incluyen: mamíferos; aves; reptiles; y anfibios. Los mamíferos adecuados incluyen: rumiantes; ungulados; mamíferos domesticados; y animales lecheros. Los animales particularmente preferidos incluyen: cabras, ovejas, camellos, vacas, cerdos, caballos, bueyes, conejos y llamas. Las aves adecuadas incluyen pollos, gansos y pavos. Cuando la proteína transgénica se secreta en la leche de un animal transgénico, el animal debe poder producir al menos 0,1, 1, y más preferiblemente al menos 10 ó 100 litros de leche al año.

En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} producida transgénicamente se prepara en una glándula mamaria del mamífero transgénico, por ejemplo, un rumiante, por ejemplo, una cabra.

30 En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} producida transgénicamente se secreta en la leche del mamífero transgénico, por ejemplo, un rumiante, por ejemplo, una cabra.

En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} producida transgénicamente se prepara bajo el control de un promotor específico de glándula mamaria, por ejemplo un promotor específico de la leche, por ejemplo un promotor de caseína o de proteína del suero de la leche. El promotor específico de la leche puede ser un promotor de caseína, promotor de beta lactoglobulina, promotor de proteína ácida del suero de la leche o promotor de lactoalbúmina.

40 En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} se prepara bajo el control de un promotor específico de vejiga o huevo, y la ATIII_{gmut} se secreta en la orina o en un huevo.

En realizaciones preferidas, la ATIII_{gmut} es una secuencia de nucleótidos o aminoácidos mutada de la ATIII de mamífero o primate, preferiblemente de ser humano.

45 En realizaciones preferidas, la preparación incluye al menos 1, 10 ó 100 miligramos de ATIII_{gmut}. En realizaciones preferidas, la preparación incluye al menos 1, 10 ó 100 gramos de ATIII_{gmut}.

En realizaciones preferidas, la preparación incluye al menos 1, 10, 100 ó 500 miligramos por mililitro de ATIII_{gmut}.

50 Se describe también una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de ATIII_{gmut} transgénica, o una preparación transgénica de ATIII_{gmut}, por ejemplo, una ATIII_{gmut} descrita en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 La ATIII_{gmut} o preparación de ATIII_{gmut} transgénicas pueden prepararse, por ejemplo, mediante cualquier método u organismo descrito en el presente documento.

Una preparación, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una pluralidad de moléculas producidas por uno o más animales transgénicos. En un aspecto, puede incluir moléculas de glicosilación diferente o puede ser homogénea en este aspecto.

60 Una preparación purificada, preparación sustancialmente pura de un polipéptido o un polipéptido aislado tal como se usa en el presente documento significan, en el caso de un polipéptido producido transgénicamente, un polipéptido que se ha separado de al menos otra proteína, lípido o ácido nucleico con los que se produce en el animal transgénico o en un fluido, por ejemplo leche, u otra sustancia, por ejemplo, un huevo, producidos por el animal transgénico. El polipéptido se separa preferiblemente de las sustancias, por ejemplo, anticuerpos o matriz de gel, por ejemplo, poliácridamida, que se usan para purificarlo. El polipéptido constituye preferiblemente al menos el 10, 20, 50 70, 80 ó el 95% en peso seco de la preparación purificada. Preferiblemente, la preparación contiene: polipéptido suficiente para permitir la secuenciación de la proteína; al menos 1, 10 ó 100 µg del polipéptido; al menos 1, 10 ó 100 mg del polipéptido.

Un ácido nucleico sustancialmente puro es un ácido nucleico que es uno o ambos de: no inmediatamente contiguo con cualquiera o ambas de las secuencias, por ejemplo, secuencias codificantes, con las que es inmediatamente contiguo (es decir, una en el extremo 5' y otra en el extremo 3') en el genoma que se produce de manera natural del organismo del que se deriva el ácido nucleico; o que está sustancialmente libre de una secuencia de ácido nucleico con la que se produce en el organismo del que se deriva el ácido nucleico. El término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, por ejemplo, en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un fragmento de ADNc o de ADN genómico producido mediante PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción) independiente de otras secuencias de ADN. El ADN sustancialmente puro también incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica para una secuencia de ATIII_{g_{mut}} adicional.

Los términos péptidos, proteínas y polipéptidos se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “secuencia transgénica” se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, que codifica para una o más proteínas humanas), que se inserta mediante artificio en una célula. La secuencia transgénica, también denominada en el presente documento transgén, puede convertirse en parte del genoma de un animal que se desarrolla en su totalidad o en parte a partir de esa célula. En realizaciones de la invención, la secuencia transgénica se integra en el genoma cromosómico. Si la secuencia transgénica se integra en el genoma da como resultado, simplemente en virtud de su inserción, un cambio en la secuencia de ácido nucleico del genoma en el que se inserta. Una secuencia transgénica puede ser parcial o completamente heteróloga de especie, es decir, la secuencia transgénica, o una parte de la misma, puede ser de una especie que es diferente de la de la célula en la que se introduce. Una secuencia transgénica puede ser parcial o completamente homóloga de especie, es decir, la secuencia transgénica, o una parte de la misma, puede ser de la misma especie que la de la célula en la que se introduce. Si una secuencia transgénica es homóloga (en el sentido de secuencia o en el sentido de homóloga de especie) respecto a un gen endógeno de la célula en la que se introduce, entonces la secuencia transgénica, preferiblemente, tiene una o más de las siguientes características: se diseña para su inserción, o se inserta, en el genoma de la célula de tal forma que altera la secuencia del genoma de la célula en la que se inserta (por ejemplo, se inserta en una ubicación que difiere de la del gen endógeno o su inserción da como resultado un cambio en la secuencia del gen endógeno); incluye una mutación, por ejemplo, una mutación que da como resultado una expresión errónea de la secuencia transgénica; en virtud de su inserción, puede dar como resultado la expresión errónea del gen en el que se inserta, por ejemplo, la inserción puede dar como resultado una desactivación del gen en el que se inserta. Una secuencia transgénica puede incluir una o más secuencias reguladoras de la transcripción y cualquier otra secuencia de ácido nucleico, tal como intrones, que pueden ser necesarias para un nivel deseado de patrón de expresión de un ácido nucleico seleccionado, todas operativamente unidas al ácido nucleico seleccionado. La secuencia transgénica puede incluir una secuencia potenciadora y/o secuencias que permiten la secreción.

La expresión “promotor heterólogo” tal como se usa en el presente documento, se refiere a un promotor que no está asociado normalmente con el gen que controla o es heterólogo para el mamífero en el que se introduce.

Los mamíferos se definen en el presente documento como todos los animales, excluyendo los seres humanos, que tienen glándulas mamarias y producen leche.

Tal como se usa en el presente documento, un “animal lechero” se refiere a un animal que produce leche. En realizaciones preferidas, el animal lechero produce grandes volúmenes de leche y tiene largos periodos de lactancia, por ejemplo, vacas o cabras.

Tal como se usa en el presente documento, el término “planta” se refiere a una planta completa, una parte de una planta, una célula de una planta o un grupo de células de una planta. La clase de plantas que puede usarse en el método de la invención es generalmente tan amplio como la clase de plantas superiores susceptibles de someterse a técnicas de transformación, incluyendo tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas. Incluye plantas de una variedad de niveles de ploidía, incluyendo poliploides, diploides y haploides.

La expresión “composición farmacéuticamente aceptable” se refiere a composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de ATIII_{g_{mut}}, formulada junto con uno o más vehículo(s) farmacéuticamente aceptable(s).

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

60 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa las secuencias de aminoácidos y de ADNc de la ATIII humana.

65 Descripción detallada de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que las formas mutadas de la ATIII pueden facilitar la actividad anticoagulante y/o antiangiogénica de la ATIII. Tales formas mutadas de la ATIII pueden producirse transgénicamente y secretarse en la leche de un animal transgénico.

Mamíferos transgénicos

Se conocen en la técnica métodos para generar mamíferos transgénicos no humanos que pueden usarse como fuente de células somáticas en la invención. Tales métodos pueden implicar introducir constructos de ADN en la línea germinal de un mamífero para preparar un mamífero transgénico. Por ejemplo, pueden incorporarse una o varias copias del constructo en el genoma de un embrión de mamífero mediante técnicas transgénicas convencionales. Además, pueden producirse mamíferos transgénicos no humanos usando una célula somática como una célula donadora. El genoma de la célula somática puede insertarse entonces en un ovocito y el ovocito puede fusionarse y activarse para formar un embrión reconstruido. Por ejemplo, se describen métodos de producción de animales transgénicos usando una célula somática en la publicación PCT WO 97/07669.

Aunque las cabras son una fuente preferida de células somáticas modificadas genéticamente, pueden usarse otros mamíferos no humanos. Mamíferos no humanos preferidos son rumiantes, por ejemplo, vacas, ovejas, camellos o cabras. Las cabras de origen suizo, por ejemplo, las cabras de raza alpina, Saanen y Toggenburg, son útiles en los métodos descritos en el presente documento. Ejemplos adicionales de animales no humanos preferidos incluyen bueyes, caballos, llamas y cerdos. El mamífero usado como fuente de células modificadas genéticamente dependerá del mamífero transgénico que va a obtenerse mediante los métodos de la invención ya que, a modo de ejemplo, debe introducirse un genoma de cabra en un ovocito de cabra funcionalmente enucleado.

Preferiblemente, las células somáticas para su uso en la invención se obtienen a partir de una cabra transgénica. Se conocen en la técnica métodos de producción de cabras transgénicas. Por ejemplo, puede introducirse un transgén en la línea germinal de una cabra mediante microinyección tal como se describe, por ejemplo, en Ebert *et al.* (1994) *Bio/Technology* 12:699, incorporado por el presente documento como referencia.

Otros animales transgénicos no humanos que van a usarse como fuente de células somáticas modificadas genéticamente pueden producirse introduciendo un transgén en la línea germinal del animal no humano. Pueden usarse células diana embrionarias a diversas fases de desarrollo para introducir transgenes. Se usan diferentes métodos dependiendo de la fase de desarrollo de la célula diana embrionaria. La(s) línea(s) específica(s) de cualquier animal usadas para poner en práctica esta invención se seleccionan para proporcionar una buena salud general, buenos rendimientos de embriones, buena visibilidad pronuclear en el embrión y buena capacidad reproductora. Además, el haplotipo es un factor significativo.

Líneas celulares transfectadas

Pueden usarse líneas celulares modificadas genéticamente para producir un animal transgénico. Puede introducirse un constructo modificado genéticamente en una célula mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Tal como se usa en el presente documento, los términos “transfección” y “transformación” incluyen una variedad de técnicas para introducir una secuencia transgénica en una célula huésped, incluyendo coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Además, pueden usarse vectores biológicos, por ejemplo vectores virales tal como se describe más adelante. Pueden encontrarse métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), y otros manuales de laboratorio adecuados.

Dos enfoques útiles son la electroporación y lipofección. Se describen más adelante breves ejemplos de cada uno.

El constructo de ADN puede introducirse de manera estable en una línea celular somática donadora mediante electroporación usando el siguiente protocolo: se resuspenden células somáticas, por ejemplo, fibroblastos, por ejemplo, fibroblastos embrionarios, en PBS a aproximadamente 4×10^6 células/ml. Se añaden cincuenta microgramos de ADN linealizado a los 0,5 ml de suspensión celular y se coloca la suspensión en un cubeta de separación entre electrodos de 0,4 cm (Biorad). Se realiza la electroporación usando un electroporador Gene Pulser de Biorad con un pulso de 330 voltios a 25 mA, 1000 microFaradios y resistencia infinita. Si el constructo de ADN contiene un gen de resistencia a neomicina para la selección, se seleccionan clones de resistencia a neomicina tras la incubación con 350 microgramos/ml de G418 (GibcoBRL) durante 15 días.

El constructo de ADN puede introducirse de manera estable en una línea celular somática donadora mediante lipofección usando un protocolo tal como el siguiente: se siembran en placa aproximadamente 2×10^5 células en un pocillo de 3,5 cm de diámetro y se transfectan con 2 microgramos de ADN linealizado usando LipfectAMINE™ (GibcoBRL). Cuarenta y ocho horas tras la transfección, se dividen las células 1:1000 y 1:5000 y, si el constructo de ADN contiene un gen de resistencia a neomicina para la selección, se añade G418 hasta una concentración final de 0,35 mg/ml. Se aíslan clones de resistencia a neomicina y se expanden para la crioconservación así como para la transferencia nuclear.

Expresión de proteínas específica de tejido

A menudo es deseable expresar una proteína heteróloga, por ejemplo, una forma mutada de la ATIII, en un tejido o fluido específico, por ejemplo, la leche, de un animal transgénico. La proteína heteróloga puede recuperarse a partir del tejido o fluido en el que se expresa. Por ejemplo, a menudo es deseable expresar la proteína heteróloga en la leche.

Se describen más adelante métodos para producir una proteína heteróloga bajo el control de un promotor específico de la leche. Además, se describen más adelante otros promotores específicos de tejido, así como otros elementos reguladores, por ejemplo, secuencias señal y secuencias que potencian la secreción de proteínas no secretadas.

5 Promotores específicos de la leche

Promotores transcripcionales útiles son los promotores que se activan preferentemente en células epiteliales mamarias, incluyendo promotores que controlan los genes que codifican para proteínas de la leche tales como caseínas, beta lactoglobulina (Clark *et al.*, (1989) *Bio/Technology* 7: 487-492), proteína ácida del suero de la leche (Gordon *et al.* (1987) *Bio/Technology* 5: 1183-1187) y lactoalbúmina (Soulier *et al.*, (1992) *FEBS Letts.* 297: 13). Los promotores de caseína pueden derivarse de los genes de la alfa, beta, gamma o kappa caseína de cualquier especie de mamífero; un promotor preferido se deriva del gen de la beta caseína de cabra (DiTullio, (1992) *Bio/Technology* 10:74-77). El promotor o promotores de proteínas específicas de la leche que se activan específicamente en el tejido mamario puede (n) derivarse de secuencias genómicas o de ADNc. Preferiblemente, son de origen genómico.

Está disponible información de la secuencia de ADN para los genes específicos de glándula mamaria enumerados anteriormente, en al menos uno, y a menudo en varios organismos. Véase, por ejemplo, Richards *et al.*, *J. Biol. Chem.* 256, 526-532 (1981) (α -lactoalbúmina de rata); Campbell *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12, 8685-8697 (1984) (WAP de rata); Jones *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260, 7042-7050 (1985) (β -caseína de rata); Yu-Lee & Rosen, *J. Biol. Chem.* 258, 10794-10804 (1983) (γ -caseína de rata); Hall, *Biochem. J.* 242, 735-742 (1987) (α -lactoalbúmina humana); Stewart, *Nucleic Acids Res.* 12, 389 (1984) (ADNc de α s1 y κ caseína bovina); Gorodetsky *et al.*, *Gene* 66, 87-96 (1988) (β -caseína bovina); Alexander *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 178, 395-401 (1988) (κ -caseína bovina); Brignon *et al.*, *FEBS Lett.* 188, 48-55 (1977) (α S2-caseína bovina); Jamieson *et al.*, *Gene* 61, 85-90 (1987), Ivanov *et al.*, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 425-429 (1988), Alexander *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 17, 6739 (1989) (β -lactoglobulina bovina); Vilotte *et al.*, *Biochimie* 69, 609-620 (1987) (β -lactoalbúmina bovina). Se revisa la estructura y función de los diversos genes de proteínas de la leche por Mercier & Vilotte, *J. Dairy Sci.* 76, 3079-3098 (1993) (incorporado como referencia en su totalidad para todos los fines). Si son útiles secuencias flanqueantes adicionales en la optimización de la expresión de la proteína heteróloga, tales secuencias pueden clonarse usando las secuencias existentes como sondas. Pueden obtenerse secuencias reguladoras específicas de glándula mamaria a partir de diferentes organismos explorando bibliotecas de tales organismos usando secuencias de nucleótidos afines conocidas, o anticuerpos frente proteínas afines como sondas.

Secuencias señal

Secuencias señal útiles son secuencias señal específicas de la leche u otras secuencias señal que dan como resultado la secreción de proteínas eucariotas o procarioras. Preferiblemente, la secuencia señal se selecciona de secuencias señal específicas de la leche, es decir, es de un gen que codifica para un producto secretado en la leche. Lo más preferiblemente, la secuencia señal específica de la leche está relacionada con el promotor específico de la leche usado en el constructo, que se describen más adelante. El tamaño de la secuencia señal no es crítico. Todo lo que se requiere es que la secuencia sea de un tamaño suficiente para efectuar la secreción de la proteína recombinante deseada, por ejemplo, en el tejido mamario. Por ejemplo, pueden usarse secuencias señal de genes que codifican para caseínas, por ejemplo, alfa, beta, gamma o kappa caseínas, beta lactoglobulina, proteína ácida del suero de la leche y lactoalbúmina. Una secuencia señal preferida es la secuencia señal de la β -caseína de cabra.

También pueden usarse secuencias señal de otras proteínas secretadas, por ejemplo, proteínas secretadas por células renales, células pancreáticas o células hepáticas. Preferiblemente, la secuencia señal da como resultado la secreción de proteínas en, por ejemplo, orina o sangre.

Regiones amino terminales de proteínas secretadas

Una proteína secretada también puede modificarse de tal manera que se secrete tal como mediante inclusión en la proteína que ha de secretarse de toda o parte de la secuencia codificante de una proteína que normalmente se secreta. Preferiblemente, no se incluye la secuencia completa de la proteína que normalmente se secreta en la secuencia de la proteína, sino sólo una parte suficiente del extremo amino terminal de la proteína que normalmente se secreta para dar como resultado la secreción de la proteína. Por ejemplo, se fusiona una proteína que normalmente no se secreta (normalmente en su extremo amino terminal) con una parte amino terminal de una proteína que normalmente se secreta.

En un aspecto, la proteína que normalmente se secreta es una proteína que normalmente se secreta en la leche. Tales proteínas incluyen proteínas secretadas por células epiteliales mamarias, proteínas de la leche tales como caseínas, beta lactoglobulina, proteína ácida del suero de la leche y lactoalbúmina. Las proteínas caseínas incluyen genes de la alfa, beta, gamma o kappa caseína de cualquier especie de mamífero. Una proteína preferida es la beta caseína, por ejemplo, beta caseína de cabra. Las secuencias que codifican para la proteína secretada pueden derivarse de o bien secuencias genómicas o bien de ADNc. Preferiblemente, son de origen genómico e incluyen uno o más intrones.

Otros promotores específicos de tejido

Pueden usarse otros promotores específicos de tejido que proporcionan expresión en un tejido particular. Los promotores específicos de tejido son promotores que se expresan más fuertemente en un tejido particular que en otros. Los promotores específicos de tejido se expresan a menudo esencialmente en el tejido específico de manera exclusiva.

Los promotores específicos de tejido que pueden usarse incluyen: un promotor neuroespecífico, por ejemplo, nestina, Wnt-1, Pax-1, Engrailed-1, Engrailed-2, Sonic hedgehog; un promotor específico del hígado, por ejemplo, albúmina, alfa-1 antitripsina; un promotor específico del músculo, por ejemplo, miogenina, actina, MyoD, miosina; un promotor específico del ovocito, por ejemplo, ZP1, ZP2, ZP3; un promotor específico de los testículos, por ejemplo, protamina, fertilina, proteína 1 del complejo sinaptonémico; un promotor específico de la sangre, por ejemplo, globulina, GATA-1, porfobilinógeno desaminasa; un promotor específico de los pulmones, por ejemplo, proteína C tensioactiva; un promotor específico de la piel o de la lana, por ejemplo, queratina, elastina; promotores específicos del endotelio, por ejemplo, Tie-1, Tie-2; y un promotor específico del hueso, por ejemplo, BMP.

Además, pueden usarse promotores generales para la expresión en varios tejidos. Los ejemplos de promotores generales incluyen β -actina, ROSA-21, PGK, FOS, c-myc, Jun-A, y Jun-B.

Secuencias aislantes

Los constructos de ADN usados para preparar un animal transgénico pueden incluir al menos una secuencia aislante. Las expresiones “aislante”, “secuencia aislante” y “elemento aislante” se usan de manera intercambiable en el presente documento. Un elemento aislante es un elemento de control que aísla la transcripción de genes colocados dentro de su intervalo de acción pero que no perturba la expresión génica, ni positiva ni negativamente. Preferiblemente, se inserta una secuencia aislante en cualquier lado de la secuencia de ADN que va a transcribirse. Por ejemplo, el aislante puede colocarse de aproximadamente 200 pb a aproximadamente 1 kb en posición 5' desde el promotor, y al menos aproximadamente de 1 kb a 5 kb desde el promotor, en el extremo 3' del gen de interés. La distancia de la secuencia aislante desde el promotor y el extremo 3' del gen de interés pueden determinarse por los expertos en la técnica, dependiendo de los tamaños relativos del gen de interés, el promotor y el potenciador usados en el constructo. Además, puede colocarse más de una secuencia aislante en 5' desde el promotor o en el extremo 3' del transgén. Por ejemplo, pueden colocarse dos o más secuencias aislantes en 5' desde el promotor. El aislante o aislantes en el extremo 3' del transgén pueden colocarse en el extremo 3' del gen de interés o en el extremo 3' de una secuencia reguladora en 3', por ejemplo, una región no traducida en 3' (UTR) o una secuencia flanqueante en 3'.

Un aislante preferido es un segmento de ADN que abarca el extremo 5' del locus de β -globina de pollo y que corresponde al sitio hipersensible constitutivo en 5' de pollo tal como se describe en la publicación PCT 94/23046, cuyo contenido se incorpora al presente documento como referencia.

Constructos de ADN

Puede montarse un casete que codifica para una proteína heteróloga como un constructo que incluye un promotor para un tejido específico, por ejemplo, para células epiteliales mamarias, por ejemplo, un promotor de caseína, por ejemplo, un promotor de beta caseína de cabra, una secuencia señal específica de la leche, por ejemplo, una secuencia señal de caseína, por ejemplo, una secuencia señal de β -caseína y un ADN que codifica para la proteína heteróloga.

El constructo también puede incluir una región no traducida en 3' en el sentido de 3' de la secuencia de ADN que codifica para la proteína no secretada. Tales regiones pueden estabilizar el transcrito de ARN del sistema de expresión y por tanto aumenta el rendimiento de la proteína deseada a partir del sistema de expresión. Entre las regiones no traducidas en 3' útiles en los constructos para su uso en la invención, están secuencias que proporcionan una señal de poli A. Tales secuencias pueden derivarse, por ejemplo, del antígeno t pequeño de SV40, la región no traducida en 3' de la caseína u otras secuencias no traducidas en 3' bien conocidas en la técnica. En un aspecto, la región no traducida en 3' se deriva de una proteína específica de la leche. La longitud de la región no traducida en 3' no es crítica pero el efecto de estabilización de su transcrito de poli A parece ser importante en la estabilización del ARN de la secuencia de expresión.

Opcionalmente, el constructo puede incluir una región no traducida en 5' entre el promotor y la secuencia de ADN que codifica para la secuencia señal. Tales regiones no traducidas pueden ser de la misma región de control de la que se toma el promotor o pueden ser de un gen diferente, por ejemplo, pueden derivarse de otras fuentes sintéticas, semisintéticas o naturales. De nuevo, su longitud específica no es crítica, sin embargo, parece ser útil en la mejora del nivel de expresión.

El constructo también puede incluir aproximadamente el 10%, 20%, 30% o más de la región codificante en N-terminal de un gen expresado preferentemente en células epiteliales mamarias. Por ejemplo, la región codificante en N-terminal puede corresponder al promotor usado, por ejemplo, una región codificante en N-terminal de la β -caseína de cabra.

El constructo puede prepararse usando métodos conocidos en la técnica. El constructo puede prepararse como parte de un plásmido más grande. Tal preparación permite la clonación y selección de las construcciones correctas de

una manera eficaz. El constructo puede ubicarse entre sitios de restricción convenientes en el plásmido de modo que puede aislarse fácilmente de las secuencias de plásmido restantes para su incorporación en el mamífero deseado.

Ovocitos

Pueden obtenerse ovocitos para su uso en la invención en diversos momentos durante el ciclo reproductor del animal. Pueden obtenerse ovocitos en diversas fases del ciclo celular y entonces inducirse *in vitro* para que entren en una fase particular de la meiosis. Por ejemplo, los ovocitos cultivados en medio privado de suero se detienen en metafase. Además, los ovocitos detenidos pueden inducirse para que entren en telofase mediante activación con suero.

Los ovocitos pueden hacerse madurar *in vitro* antes de que se usen para formar un embrión reconstruido. Este proceso requiere normalmente recoger ovocitos inmaduros de ovarios de mamífero, por ejemplo, un ovario caprino, y hacer que el ovocito madure en un medio antes de la enucleación hasta que el ovocito alcanza la fase meiótica deseada, por ejemplo, metafase o telofase. Además, pueden usarse ovocitos que se han hecho madurar *in vivo* para formar un embrión reconstruido.

Pueden recogerse ovocitos de un mamífero hembra durante la superovulación. En resumen, pueden recuperarse quirúrgicamente ovocitos, por ejemplo, ovocitos caprinos, mediante la expulsión de los ovocitos del oviducto del donador hembra. Se describen en el presente documento métodos de inducción de la superovulación en cabras y la recogida de ovocitos caprinos.

Transferencia de embriones reconstruidos

Puede transferirse un embrión reconstruido a una hembra receptora y dejar que se desarrolle en un mamífero clonado o transgénico. Por ejemplo, el embrión reconstruido puede transferirse mediante las fimbrias en la luz del oviducto de cada hembra receptora. Además, se conocen en la técnica métodos de transferencia de un embrión a un mamífero receptor y se describen, por ejemplo, en Ebert *et al.* (1994) *Bio/Technology* 12:699.

Purificación de proteínas a partir de la leche

La proteína transgénica, por ejemplo, una forma mutada de la ATIII, puede producirse en la leche a concentraciones relativamente altas y en grandes volúmenes, proporcionando una producción de nivel alto continua del péptido procesado de manera normal que se recoge fácilmente a partir de una fuente renovable. Existen varios métodos diferentes conocidos en la técnica para el aislamiento de proteínas a partir de la leche.

Las proteínas de la leche se aíslan normalmente mediante una combinación de procedimientos. En primer lugar, se fracciona la leche cruda para eliminar grasas, por ejemplo, mediante desnatado, centrifugación, sedimentación (H.E. Swaisgood, *Developments in Dairy Chemistry, I: Chemistry of Milk Protein*, Applied Science Publishers, NY, 1982), precipitación con ácido (patente estadounidense número 4.644.056) o coagulación enzimática con renina o quimotripsina (Swaisgood, citado anteriormente). A continuación, pueden fraccionarse las principales proteínas de la leche en o bien una disolución transparente o bien un precipitado en grandes cantidades a partir del cual puede purificarse fácilmente la proteína específica de interés.

La patente francesa número 2487642 describe el aislamiento de proteínas de la leche a partir de leche desnatada o suero de la leche mediante ultrafiltración con membrana en combinación con cromatografía de exclusión o cromatografía de intercambio iónico. En primer lugar, se produce suero de la leche eliminando la caseína mediante coagulación con cuajo o ácido láctico. La patente estadounidense número 4.485.040 describe el aislamiento de un producto enriquecido en alfa-lactoglobulina en el material retenido a partir del suero de la leche mediante dos etapas de ultrafiltración secuenciales. La patente estadounidense número 4.644.056 proporciona un método para purificar inmunoglobulinas a partir de la leche o el calostro mediante precipitación con ácido a pH 4,0-5,5, y filtración de flujo cruzado secuencial en primer lugar sobre una membrana con un tamaño de poro de 0,1 - 1,2 micrómetros para clarificar la fuente de producto y luego sobre una membrana con un límite de separación de 5 - 80 kd para concentrarla.

De manera similar, la patente estadounidense número 4.897.465 enseña la concentración y enriquecimiento de una proteína tal como una inmunoglobulina a partir del suero sanguíneo, yemas de huevo o suero de la leche mediante ultrafiltración secuencial sobre membranas de óxido metálico con un desplazamiento de pH. Se lleva a cabo la filtración en primer lugar a un pH por debajo del punto isoeléctrico (pI) de la proteína seleccionada para eliminar los contaminantes en grandes cantidades del material retenido de proteína, y a continuación a un pH por encima del pI de la proteína seleccionada para retener impurezas y hacer que la proteína seleccionada pase al material permeado. La patente europea número 467 482 B1 enseña un método de concentración por filtración diferente en el que se reduce leche desnatada desgrasada hasta pH 3-4, por debajo del pI de las proteínas de la leche, para solubilizar tanto la caseína como las proteínas del suero de la leche. Se realizan tres rondas sucesivas de ultrafiltración o diafiltración, luego se concentran las proteínas para formar un material retenido que contiene un 15-20% de sólidos, del cual el 90% es proteína. Alternativamente, la solicitud de patente británica número 2179947 da a conocer el aislamiento de lactoferrina a partir del suero de la leche mediante ultrafiltración para concentrar la muestra, seguido por cromatografía de intercambio catiónico débil a aproximadamente pH neutro. No se comunica medición de la pureza. En la publicación PCT WO 95/22258, una proteína, tal como lactoferrina, se recupera a partir de leche que se ha ajustado a fuerza iónica alta mediante la adición de sal concentrada, seguido por cromatografía de intercambio catiónico.

ES 2 299 425 T3

En todos estos métodos, se trata en primer lugar leche o una fracción de la misma para eliminar las grasas, lípidos y otra materia particulada que obstruiría las membranas de filtración o los medios de cromatografía. Las fracciones iniciales así producidas pueden consistir en caseína, suero o proteína de la leche total, a partir de la cual se aísla entonces la proteína de interés.

5 La publicación de patente PCT número WO 94/19935 da a conocer un método de aislamiento de una proteína biológicamente activa a partir de leche entera estabilizando la solubilidad de las proteínas de la leche totales con un agente cargado positivamente tal como arginina, imidazol o Bis-Tris. Este tratamiento forma una disolución clarificada a partir de la cual puede aislarse la proteína, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas que de otra forma se obstruirían por las proteínas precipitadas.

10 El documento USSN 08/648.235 da a conocer un método para aislar un componente soluble de la leche, tal como un péptido, en su forma biológicamente activa a partir de leche entera o una fracción de leche mediante filtración por flujo tangencial. A diferencia de los métodos de aislamiento anteriores, éste elimina la necesidad de un primer fraccionamiento de la leche entera para eliminar micelas de caseína y grasa, simplificando de ese modo el procedimiento y evitando pérdidas de recuperación y bioactividad. Este método puede usarse en combinación con etapas de purificación adicionales para eliminar además contaminantes y purificar el producto, por ejemplo, una proteína, de interés.

20 *Producción de fragmentos y análogos*

El experto en la técnica puede alterar la estructura dada a conocer de la ATIII produciendo fragmentos o análogos, y someter a prueba las estructuras recién producidas para determinar la actividad. Más adelante se facilitan ejemplos de métodos de la técnica anterior que permiten la producción y prueba de los fragmentos y análogos. Estos, u otros métodos, pueden usarse para preparar y seleccionar fragmentos y análogos de un polipéptido de la ATIII. En realizaciones preferidas, la estructura de la ATIII modificada es la ATIII humana.

Generación de fragmentos

30 Pueden producirse fragmentos de una proteína de varias formas, por ejemplo, de manera recombinante, mediante digestión proteolítica o mediante síntesis química. Pueden generarse fragmentos internos o terminales de un polipéptido eliminando uno o más nucleótidos de un extremo (para un fragmento terminal) o ambos extremos (para un fragmento interno) de un ácido nucleico que codifica para el polipéptido. La expresión de ADN mutagenizado produce fragmentos de polipéptido. La digestión con endonucleasas "end-nibbling" (de corte de extremos) puede generar por tanto ADN que codifica para una serie de fragmentos. También puede generarse ADN que codifica para fragmentos de una proteína mediante cizalladura aleatoria, digestión de restricción o una combinación de los métodos tratados anteriormente.

40 También pueden sintetizarse fragmentos químicamente usando técnicas conocidas en la técnica tales como química de F-Moc o t-Boc en fase sólida de Merrifield convencional. Por ejemplo, pueden dividirse arbitrariamente los péptidos de la presente invención en fragmentos de longitud deseada sin solapamiento de los fragmentos, o dividirse en fragmentos solapantes de una longitud deseada.

Generación de análogos: producción de secuencias peptídicas y de ADN alteradas mediante métodos aleatorios

45 Pueden prepararse variantes de la secuencia de aminoácidos de una proteína mediante mutagénesis aleatoria del ADN que codifica para una proteína o una región o dominio particulares de una proteína. Los métodos útiles incluyen mutagénesis por PCR y mutagénesis por saturación. También puede generarse una biblioteca de variantes de la secuencia de aminoácidos aleatorias mediante la síntesis de un conjunto de secuencias de oligonucleótido degeneradas. (Los métodos para seleccionar proteínas en una biblioteca de variantes figuran en otra parte del presente documento.)

Mutagénesis por PCR

55 En la mutagénesis por PCR, se usa la fidelidad reducida de la Taq polimerasa para introducir mutaciones aleatorias en un fragmento clonado de ADN (Leung *et al.*, 1989, Technique 1:11-15). Éste es un método muy poderoso y relativamente rápido de introducción de mutaciones aleatorias. La región de ADN que va a mutagenizarse se amplifica usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en condiciones que reducen la fidelidad de la síntesis de ADN mediante la ADN Taq polimerasa, por ejemplo, usando una razón de GTPd/ATPd de cinco y añadiendo Mn^{2+} a la reacción de PCR. Se inserta el grupo de fragmentos de ADN amplificados en vectores de clonación apropiados para proporcionar bibliotecas mutantes aleatorias.

Mutagénesis por saturación

65 La mutagénesis por saturación permite la introducción rápida de un gran número de sustituciones de base única en fragmentos de ADN clonados (Mayers *et al.*, 1985, Science 229:242). Esta técnica incluye la generación de mutaciones, por ejemplo, mediante tratamiento químico o irradiación de ADN monocatenario *in vitro*, y síntesis de una hebra de ADN complementaria. La frecuencia de mutación puede modularse modulando la intensidad del tratamiento, y

pueden obtenerse esencialmente todas las sustituciones de base posibles. Debido a que este procedimiento no implica una selección genética para seleccionar fragmentos mutantes, se obtienen ambas sustituciones neutras, así como las que alteran la función. La distribución de las mutaciones puntuales no está sesgada hacia los elementos de secuencia conservada.

5 *Oligonucleótidos degenerados*

También puede generarse una biblioteca de homólogos a partir de un conjunto de secuencias de oligonucleótidos degenerados. Puede llevarse a cabo la síntesis química de secuencias degeneradas en un sintetizador automático de ADN, y entonces ligarse los genes sintéticos en un vector de expresión apropiado. La síntesis de oligonucleótidos degenerados se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.* (1981) *Recombinant ADN. Proc 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier págs. 273-289; Itakura *et al.* (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.* (1984) *Science* 198:1056; Ike *et al.* (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477. Tales técnicas se han empleado en la evolución directa de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott *et al.* (1990) *Science* 249:386-390; Roberts *et al.* (1992) *PNAS* 89:2429-2433; Devlin *et al.* (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla *et al.* (1990) *PNAS* 87: 6378-6382; así como las patentes estadounidenses números 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

20 *Generación de análogos: producción de secuencias peptídicas y de ADN alteradas mediante mutagénesis dirigida*

Pueden usarse técnicas de mutagénesis no aleatoria o dirigida para proporcionar mutaciones o secuencias específicas en regiones específicas. Estas técnicas pueden usarse para crear variantes que incluyen, por ejemplo, deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de la secuencia de aminoácidos conocida de una proteína. Los sitios para la mutación pueden modificarse individualmente o en serie, por ejemplo, (1) mediante sustitución en primer lugar de aminoácidos conservados y luego con más elecciones de radical dependiendo de los resultados logrados, (2) deleción del residuo diana o (3) inserción de residuos de la misma clase o una diferente adyacentes al sitio ubicado, o combinaciones de las opciones 1-3.

30 *Mutagénesis mediante alanina*

La mutagénesis mediante alanina ("alanine scanning mutagenesis") es un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones de la proteína deseada que son ubicaciones o dominios preferidos para la mutagénesis, Cunningham and Wells (*Science* 244:1081-1085, 1989). En la mutagénesis mediante alanina, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se sustituye por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferiblemente, alanina o polialanina). La sustitución de un aminoácido puede afectar a la interacción de los aminoácidos con el entorno acuoso circundante en el interior o exterior de la célula. Los dominios que demuestran una sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces introduciendo otras variantes o adicionales en o para los sitios de sustitución. Por tanto, mientras se predetermina el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos, no es necesario predeterminar la naturaleza de la mutación *per se*. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, puede realizarse mutagénesis aleatoria o mediante alanina en el codón o región diana y se seleccionan las variantes de subunidad proteica deseadas expresadas para determinar la combinación óptima de actividad deseada.

45 *Mutagénesis mediada por oligonucleótido*

La mutagénesis mediada por oligonucleótido es un método útil para preparar variantes de sustitución, deleción e inserción de ADN, véase, por ejemplo, Adelman *et al.*, (*ADN* 2:183, 1983). En resumen, se altera el ADN deseado hibridando un oligonucleótido que codifica para una mutación con un molde de ADN, en el que el molde es la forma monocatenaria de un plásmido o bacteriófago que contiene la secuencia de ADN inalterada o nativa de la proteína deseada. Tras la hibridación, se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra complementaria completa del molde que incorporará por tanto el cebador de oligonucleótido, y codificará para la alteración seleccionada en el ADN de la proteína deseada. Generalmente, se usan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios al molde en cualquier lado del/de los nucleótido(s) que codifica(n) para la mutación. Esto garantiza que el oligonucleótido hibridará de manera apropiada con la molécula de molde de ADN monocatenario. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente usando técnicas conocidas en la técnica tales como las descritas por Crea *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5765 [1978]).

60 *Mutagénesis de casete*

Otro método para preparar variantes, la mutagénesis de casete, se basa en la técnica descrita por Wells *et al* (*Gene*, 34:315). El material de partida es un plásmido (u otro vector) que incluye el ADN de la subunidad proteica que va a mutarse. Se identifica(n) el/los codón(es) en el ADN de la subunidad proteica que va a mutarse. Debe haber un único sitio de endonucleasa de restricción en cada lado del/de los sitio(s) de mutación identificado(s). Si no existen tales sitios de restricción, pueden generarse usando el método de mutagénesis mediada por oligonucleótido descrito anteriormente para introducirlos en ubicaciones apropiadas en el ADN de la subunidad proteica deseada. Tras haberse introducido los sitios de restricción en el plásmido, se corta el plásmido en estos sitios para linealizarlo. Se sintetiza, usando procedimientos convencionales, un oligonucleótido bicatenario que codifica para la secuencia del ADN entre los sitios

ES 2 299 425 T3

de restricción pero que contiene la(s) mutación(es) deseada(s). Se sintetizan las dos hebras de manera separada y luego se hibridan juntas usando técnicas convencionales. Este oligonucleótido bicatenario se denomina casete. Este casete se diseña para que tenga extremos 3' y 5' que sean comparables con los extremos del plásmido linealizado, de modo que pueda ligarse directamente al plásmido. Este plásmido contiene ahora la secuencia de ADN de la subunidad proteica deseada mutada.

Mutagénesis combinatoria

También puede usarse mutagénesis combinatoria para generar mutantes. Por ejemplo, se alinean las secuencias de aminoácidos para un grupo de proteínas homólogas u otras relacionadas, preferiblemente para promover la más alta homología posible. Todos los aminoácidos que aparecen en una posición dada de las secuencias alineadas pueden seleccionarse para crear un conjunto degenerado de secuencias combinatorias. Se genera la biblioteca abigarrada de variantes mediante mutagénesis combinatoria a nivel del ácido nucleico, y se codifica mediante una biblioteca génica abigarrada. Por ejemplo, puede ligarse enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de modo que el conjunto degenerado de posible secuencias puede expresarse como péptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes que contiene el conjunto de secuencias degeneradas.

Ejemplos

Se produjeron todos los mutantes en un vector pUC mediante mutagénesis por hueco en el caso de T85M, T85K, N187D, N135Q y K114Q. Se sintetizaron oligonucleótidos (Operon) con cambios en el codón deseado para cambiar su designación de aminoácidos y también se introdujeron mutaciones silenciosas en codones vecinos para exagerar la diferencia entre el tipo natural y el mutante en la selección por hibridación. Se usaron los siguientes oligonucleótidos:

```
T85M:CCTGAGTATCagtAtGGCcTTTGCTATGAS
      L S I S M A F A M
T85K:CCTGAGTATCAGTAAGGCCTTTGCTATGAC
      L S I S K A F A M
N187D:CAGAGCGGCCATagACAAgTGGGTGTCC
      R A A I D K W V S
N135Q:CTATCGAAAAGCacagAAgTCCTCCAAGTTAG
      Y R K A Q K S S K L

K114Q:CACCATATCgGAacAAACcTCTGATCAGA
      T I S E Q T S D Q
```

Se realizó la mutagénesis por hueco tal como se describió anteriormente. En resumen, se digirió el plásmido pAT-7 en los sitios de restricción únicos SacII y HpaI y se purificó en gel el vector a partir del inserto de 600 pb y se extrajo de la agarosa usando Gene Clean (Bio101). Se combinó este fragmento con una cantidad similar de pAT-7 digerido con XmnI y entonces se sometió a ebullición el oligonucleótido mutante fosforilado en un baño de agua durante 7 minutos. Entonces, se dejó que los fragmentos volvieran a hibridar a 37°C durante 30 minutos. Se llenó el hueco y se ligó con Klenow y ligasa de T4 en tampón de ligación 1x. Tras la transformación en células supercompetentes XL-1 Blue y sembrado en placa sobre filtros de nitrocelulosa en placas Lbamp, se obtuvieron duplicados de los filtros y se seleccionaron mediante hibridación utilizando oligonucleótido mutante tratado con cinasa. Se fijó la temperatura de la hibridación a 5°C por debajo de la temperatura de fusión del oligonucleótido para diferenciar entre el tipo natural y el mutante.

Se crearon dos mutantes truncados usando o bien PCR en el caso del truncamiento en el sitio de elastasa y un oligonucleótido en el caso del sitio de trombina. Se sometió a PCR el mutante truncado de elastasa usando un oligonucleótido que estaba en 5' respecto al sitio XhoI en pAT-7 y un oligonucleótido que era homólogo a la secuencia 5' del sitio de elastasa con un codón de terminación y una secuencia adaptadora de SalI. Se realizó la PCR usando la Pfu polimerasa y el tampón del fabricante con la temperatura de rehibridación 4°C por debajo de la temperatura de fusión calculada. Se purificó en gel el producto de PCR y tras la digestión con SalI y XhoI, se ligó en un vector pUC19 modificado. Se creó la ATIII truncada en el sitio de trombina insertando un oligonucleótido bicatenario (Operon, véase más adelante) con extremos de NsiI y XhoI y un sitio BglII y un codón de terminación en el extremo 3', en el clon de ADNc de tipo natural.

Se sintetizó la forma desglucosilada como un fragmento de restricción de Sac2-HpaI cambiando las cuatro asparaginas del sitio de glicosilación por glutaminas y optimizando el uso del codón para la expresión en mamíferos y eliminando una secuencia de desestabilización mediante Operon y se ligó en el tipo natural sometido a restricción con Sac2-HpaI. Se subclonaron todos los mutantes excepto la trombina truncada y N135Q en un vector de expresión de mamíferos pCEP-4 (Invitrogen) y se transfectaron en una cepa de células 293 que son positivas para la proteína nuclear EBNA-1 usando LipofectAmine Plus (Life Technologies). Este sistema da normalmente un 80-90% de eficacia de transfección basándose en la tinción de beta galactosa. Tras 48 horas, se sometieron los lisados celulares y

ES 2 299 425 T3

los medios condicionados a SDS-PAGE al 10-18% e inmunotransferencia de tipo Western. Se examinó con sonda la inmunotransferencia con un anticuerpo anti-ser humano (ATIII) conjugado con HRP (Biodesign International).

Se usaron vectores transgénicos (BC800 y BC350) que contenían el promotor de beta caseína de cabra, UTR 3' y secuencias aislantes para subclonar estos insertos mutantes para la microinyección en ovocitos de ratón. Se han inyectado cinco mutantes hasta ahora, el sitio de trombina truncada (BC896), sitio de elastasa truncada (BC898), no glicosilada (BC897), forma beta (BC899) y trombina truncada no glicosilada (BC929). Cuatro tenían fundadores identificados usando un conjunto de cebadores específico de ATIII sobre preparaciones de ADN de cola (protocolo de la proteinasa K convencional). Se produjo un bajo porcentaje de transgénicos, aproximadamente un 5-8%, y se aparearon estos para generar leche y progenie F1. Se analizó la leche para determinar la ATIII truncada en el sitio de trombina mediante inmunotransferencia de tipo Western y un ratón estaba produciendo en un exceso de 0,5 mg/ml y otro ratón en un exceso de 2 mg/ml. Aunque mucho de esto está agregado, existe todavía una parte sustancial que migra al nivel del monómero. Además de esta prueba de que la proteína está plegada apropiadamente, se estudió la leche también en un formato de ELISA en el que una cantidad constante de ATIII o bien de tipo natural o bien truncada se capturó por anticuerpos policlonales de cabra anti-ATIII humana y luego se tituló frente a eso un anticuerpo de oveja anti-ATIII humana conjugado con peroxidasa. Las curvas de titulación eran muy cercanas, lo que sugiere que la mayoría de los epítomos están disponibles y que debe estar plegada apropiadamente. También se analizó mediante inmunotransferencia de tipo Western leche del mutante no glicosilado. Incluso en condiciones reductoras, la mayor parte del material se mantuvo agregado. El carril no reducido estaba casi completamente agregado. Las hembras fundadoras con leche de ATIII beta secretaron bajas cantidades de proteína en la leche.

Se sometieron a prueba la mayor parte de los constructos para determinar la expresión en cultivo de tejidos, pero debido a la naturaleza de la generación de ratones transgénico sólo se microinyectó a formas seleccionadas. Los resultados de estos experimentos se han resumido en la tabla II. En todos los experimentos de cultivo de tejidos se expresaron grandes cantidades de las proteínas en las células, pero sólo en dos ejemplos la ATIII de tipo natural y el mutante conservador Wibble (T85M) dieron cantidades significativas de las proteínas fuera de las células. La mayoría del material en la células parece no procesarse en la forma madura. Se han preparado cinco variantes de la ATIII en ratones transgénicos hasta este punto. Dos formas truncadas, una en el sitio de trombina (GTC896) y la otra en el sitio de escisión de elastasa (GTC898), la forma no glicosilada truncada en el sitio de escisión de trombina (GTC928), una forma no glicosilada por sí misma (GTC897) y la forma beta N135Q (GTC899). Se identificaron fundadores mediante análisis por PCR del ADN de cola de ratón y se criaron para generar progenie F1 y leche para análisis de secreción. Se encontró que los cinco variantes se secretaban en la leche de estos ratones en lactancia mediante análisis de tipo Western. En condiciones no reductoras, todas las formas parecen tener una gran cantidad de agregación, especialmente la forma no glicosilada.

TABLA 1

Lista de constructos

<u>Mutantes de ATIII</u>	<u>pUC</u>	<u>pCEP4</u>	<u>pBC</u>
ATIII de tipo natural	pAT7	845	197
Wibble T85M	843	852	855
Wobble T85K	844	853	856
N187D Rouen VI	849	858	
N135Q forma beta	872		899
K114Q no unión a heparina	880	888	
Desglicosilada	879	887	897
Truncada a) sitio de elastasa	881	889	898
Truncada b) sitio de trombina	884	920	896
Truncada/no glicosilada	916	928	929
Truncada (sitio de trombina): hSA	925	932	933
Fusión			
Fusión beta caseína:PF4/47-70	927		931
PF4/47-70	935		
Fusión hSA:PF4/47-70	936	956	943

ES 2 299 425 T3

TABLA 2

Expresión de constructos de ATIII y ATIII_{gmut}

	<u>Mutantes de ATIII</u>	<u>Cultivo de tejidos</u>	<u>Leche</u>	<u>Unión a heparina</u>
5	Tipo natural	1	2000	+
10	T85M Wibble	0,5		
	T85K Wobble	-		
	N187Q Rouen VI	-		
15	N135Q forma beta		500	
	K114Q no unión a heparina	-		
	No glicosilada	-	1000	
20	Truncada a) sitio de elastasa	-	1000	+
	Truncada b) sitio de trombina	-	2000	
25	Truncada (sitio de trombina)/no glicosilada	-	500	
	Truncada (sitio de trombina): hSA			
30				
35				
40				
45				
50				
55				
60				
65				

REIVINDICACIONES

5 1. Antitrombina III humana mutada producida transgénicamente (ATIII_{tg_{mut}}) que tiene actividad antiangiogénica, en la que el bucle reactivo de la ATIII no es reactivo para su uso como medicamento.

2. ATIII mutada según la reivindicación 1, en la que el bucle reactivo está plegado.

3. ATIII mutada según la reivindicación 1, en la que el bucle reactivo está parcial o completamente eliminado.

10 4. ATIII mutada según la reivindicación 2, en la que la ATIII se muta alterando al menos una hélice alfa que subyace a la lámina beta.

15 5. ATIII mutada según la reivindicación 4, en la que la hélice alfa se altera mediante inserción, deleción o una sustitución de al menos un nucleótido de la secuencia que codifica para una hélice alfa de la ATIII.

6. ATIII mutada según la reivindicación 5, en la que se cambia una treonina en la posición 85 de la ATIII humana por una metionina.

20 7. ATIII mutada según la reivindicación 5, en la que se cambia una treonina en la posición 85 de la ATIII humana por una lisina.

8. ATIII mutada según la reivindicación 5, en la que se cambia una asparagina en la posición 187 de la ATIII humana por un ácido aspártico.

25 9. ATIII mutada según la reivindicación 3, en la que se muta la ATIII eliminando una parte o todo el extremo C-terminal de la ATIII.

30 10. ATIII mutada según la reivindicación 9, en la que se eliminan aproximadamente 50 aminoácidos o menos del extremo C-terminal.

11. ATIII mutada según la reivindicación 10, en la que se elimina el extremo C-terminal en un sitio de elastasa de la ATIII.

35 12. ATIII mutada según la reivindicación 10, en la que se elimina el extremo C-terminal en un sitio de escisión de trombina de la ATIII.

40 13. ATIII mutada según la reivindicación 10, en la que se altera el bucle reactivo de la ATIII dejando que la hebra beta del bucle reactivo se pliegue en una lámina beta.

14. Método para preparar ATIII_{tg_{mut}} transgénica que comprende:

45 proporcionar un mamífero no humano transgénico que incluye una secuencia de ADN que codifica para una ATIII_{tg_{mut}} que tiene actividad antiangiogénica, en la que el bucle reactivo de la ATIII no es reactivo, bajo el control de un promotor específico de la leche;

dejar que se exprese ATIII_{tg_{mut}}, preparando de ese modo ATIII_{tg_{mut}}.

50 15. Método según la reivindicación 14, en el que el mamífero se selecciona del grupo que consiste en una cabra, una oveja, una vaca, un cerdo, un conejo, una rata y un ratón.

55 16. Método según la reivindicación 14, en el que el promotor específico de la leche se selecciona del grupo que consiste en: un promotor de caseína, un promotor de beta lactoglobulina, un promotor de proteína ácida del suero de la leche y un promotor de lactoalbúmina.

60

65

ES 2 299 425 T3

Figura 1. Antitrombina III, secuencia de aminoácidos y ADNc.

```

XbaI
1 CTCTGAGTTCACACCAATCTATTCCAAATGTGATAGGAACTGTAACTCTGGAAAAGGAGGTTTATCTTTTGTCCCTTGCCTGCATTTGG
  1> M Y S N V I G T V T S G K R K V Y L L S L L L I G
                                     SacI
90 CTTCTGGGACTGCTGACCTGTCTACGGGAGCCNGTGGGACATCTGCACAGCCAGCCGCGGGACATTCOCATGAAATCCCATGTGCATTT
257 F W D C V T C H G S P V D I C T A K P R D I P M N P M C I
179 A CCGCTCCCGGAGAGAAAGCCAACTGAGGATGAGGGCTTCAGAACAGAGATCCCGGCGCCACCAACCGCGCTGTCTGGAACTGTCC
55 P Y R S P E K K A T E D E Q S E Q K I P E A T N R R V W E L S
268 AAGGCCAATTCCCGCTTGTGCTACCACTTCTATCAGCACTGGGASATTCCAGAAATCAAAATGATTAACATTTTCTGTACCCCTGAG
85 > K A N S R F A T T F Y Q H L A D S K N D N D N I F L S P L S
357 TATCTCCAGCGCTTTTCTATGACCAAGCTGGGTGCTGTANTGACACCCCTCCAGCAACTGATGGAGGTATTEAGTTTGAACACCATAT
114 P I S T A F A M T K L G A C N D T L O Q L M E V F K F D T I
446 CTGAGAAACATCTGATCA GATCCACTCTCTCTTGGCCAACTGACTGCGGACTCTATGAAAAGCCACAAATCTCCAGTATGATA
144 S E K T S D Q I H F F F A K L N C R L Y R K A N K S K L V
535 TCAGCCATCTGCTTTTGGGACAAATCCCTTACCTTCATGAGACCTACCCAGGACATCAGTGAATTTGGTATGATGGAGCCAGCTCCA
174 P S A N R L F G D K S L T F N E T Y Q D I S E L V Y G A K L Q
624 GCGCTGCACTTCAGGAAATCCAGAGCAATCCAGAGCGCGCCATCAAAATGGGTCTCCAAAGAAOOGAAGGCCAATCAACCGATG
203 > P L D F K E N A E Q S R A A I N K W V S N K T E G R I T D
                                     HpaI
713 TCATTCCTCCGAGCCATCAATGAGCTCACTGTCTCTGCTGCTGTAAACACCAATTACTTCAAGGCGCTGTGGAGTCAAGTTTACG
233 P V I P S E A I N E L T V L V L V N T I Y F K G L W K S K F S
802 CTTGAGAACACAGGAGGAACTGTCTTCAAGGCTGATGGAGATGCTGTTCAGCATCTATGATGTACCGCAAGCCAGTTCGGTTA
263 > P E N T R K E L F Y K A D G E S C S A B M M Y Q E G K F R Y
                                     NotI
891 TCGGCGCGTGGCTGAAGGCACCCAGGTGCTTGGTTGCGCTTCAAAGGTGATGACATCAACATGGTCTCTCATCTTCCCGAGCCAGGAGAA
292 P R R V A E G T Q V L E L P F K G D D I T M V L I L P K P E
980 AGAGCTTGGCCAGGTGAGAGGGAACTCAACCCAGAGTCTCCAGGAGTGGCTGGATGAAATGGAGGAGATGATGCTGTGCTCCAC
322 P K S L A K V E K E L T P E V L Q E W L D E L E E M M L V V H
1069 ATGCCCCCTTCCGCAATGAGGACCGCTTCACTTGAAGGAGCCATGCAAGACATGGGCTTGTGATCTGTTCGGCCCTGAAAATTC
352 > M P R F R I E D G F S L K E Q L Q D M G L V D L F S P E K S
                                     NotI
1158 CAAACTCCAGGTATTGTTCCAGAGCCCGAGATGACCTCTATGCTCTAGATGCAATCCATAAGGCATTTCTTGGAGCAAAATGAGAG
381 > K L P G I V A E G R D D L Y V S D A F H K A P L E V N E E
1247 CGAGTGAAGCAGCTCAGTACCGCTGTGTGATTTGCTGGCGGTTCGCTAAACCCACAGGCGTACTTTCAGGCCAACAGGCCCTTTC
411 P G S E A A A S T A V V I A G R S L N P N R V T F K A N R P F
                                     elastase thrombin
1336 CTGGTTTATAAGAGGAGTCCCTCTGAACACTATTACTTCAITGGGAGGGAGCCAAACCTTGTGTAAAGGAAAATGTCTCTAGAG
XbaI SacI
441 > L V F I R E V P L N T I I F M G R V A N P C V K .
1425 TCGACTCCAGCCCAAGCTT
    
```