



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 322 477**

(51) Int. Cl.:

**C12N 9/04** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05001460 .4**

(96) Fecha de presentación : **25.01.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1559779**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.08.2005**

(54) Título: **Deshidrogenasas de monofosfato de inosina, modificadas.**

(30) Prioridad: **30.01.2004 US 769481**

(73) Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.06.2009**

(72) Inventor/es: **Dorn, Allan R. y  
Rugaber, Janice E.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.06.2009**

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Deshidrogenasas de monofosfato de inosina, modificadas.

**5 Resumen de la invención**

La presente invención, se refiere a deshidrogenasas de monofosfato de inosina, modificadas. De una forma más particular, la invención, se refiere a deshidrogenasas de monofosfato de inosina, modificadas, provistas de colas de histidina del tipo "tag", en donde, las enzimas modificadas, tienen una actividad estabilizada para las deshidrogenasas de monofosfato de inosina del tipo salvaje.

**Antecedentes y trasfondo de la invención**

La inosin-5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH; EC 1.1.1.205), es una enzima clave en la novo-síntesis de las purinas. La IMPDH, cataliza la oxidación NDA-dependiente del monofosfato del inosin-5'-monofosfato (IMP), a xantosin-5'-monofosfato (XMP), dando como resultado la producción de NADH y XMP. La oxidación de IMP a XMP, catalizada mediante IMPDH, es el paso limitativo, en la síntesis de nucleótidos de guaninas.

El IMPDH, existe como un homotetrámero (es decir que, la enzima tiene cuatro subunidades, comprendiendo, cada una de ellas, a un polipéptido de IMPDH). La IMPDH humana del tipo I y la del tipo II, se han identificado y secuenciado. Las IMPDH humanas del tipo I y II, son ambas de 514 aminoácidos de longitud, y éstas comparten un 84% de identidad de secuencia. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la IMPDH del tipo I, se dan a conocer en Natsumeda, Y., *et al.* J. Biol. Chem. 265:5292-5295 (1990), y la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la IMPDH humana del tipo II, se da a conocer en Natsumeda, Y., *et al.*, J. Biol. Chem. 265:5292-5295 (1990), Collart, F.R. y Hubermann, E., J. Biol. Chem. 263 - 15769 - 15772 (1998), y en la patente estadounidense US nº 5.665.583. Las subunidades de los tipos de IMPDH humana del tipo I y II que forman el homotetrámero de IMPDH, tienen, cada una de ellas, un peso molecular medio de la subunidad de 56 kDa. La IMPDH humana del tipo II, tiene un dominio de núcleo catalítico (aminoácidos 1 - 109 y 245 - 514) y una función desconocida de subdominio (aminoácidos 110 - 244).

La IMPDH, es una diana para la terapia antitumoral (por ejemplo, antileucémica) y la quimioterapia inmunosupresora. La IMPDH, se encuentra aumentada, en las células neoplásicas y de diferenciación. Adicionalmente, además, los linfocitos B y T proliferativos, dependen de la novo-trayectoria, más bien que de la trayectoria salvaje, para la síntesis de nucleótidos de guanina, resultando, la inhibición de la síntesis de nucleótidos, en la inhibición de la síntesis del DNA. Así, de este modo, la IMPDH, es una importante enzima para la proliferación de las células B y T, y la inhibición de la actividad IMPDH, inhibe ambas, la proliferación de las células B y T, convirtiendo a la IMPDH en una importante diana para la quimioterapia inmunosupresora.

El ácido micofenólico (MPA), es un inhibidor no competitivo de la IMPDH humana de los tipos I y II y, el MPA, enlaza a la IMPDH, después de que se haya liberado la NADH, pero antes de que se haya producido el XMP. El MPA, es el un metabolito activo, *in vivo*, del profármaco micofenolato mofetil (CellCept; MMF). El MMF, es un inmunodepresor, el cual boquea la proliferación de las células B y T, y el MMF, ha sido aprobado para el tratamiento del rechazo de los trasplantes de riñón y del corazón. El MMF, se ha utilizado también clínicamente para tratar el cáncer y las infecciones víricas, y se ha utilizado como un agente anti-vascular hiperproliferativo, un agente antipsoriátrico, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, y ha sido utilizado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

El MMF, se hidroliza al MPA, *in vivo* y, en concordancia con ello, el control de los niveles de MPA, *in vivo*, permite el control de las dosificaciones de MPA. La medición de los niveles de MPA, en pacientes tratados con MMF, es de un gran significado clínico, debido al hecho de que, el control de los niveles de MPA, mejora la eficacia terapéutica, por ejemplo, pueden determinarse los niveles de MMF necesarios para adecuar la inmunodepresión, y minimiza los efectos laterales adversos del fármaco. La IMPDH recombinada, aislada, se ha utilizado en ensayos para medir los niveles de MPA en pacientes tratados con MMF, tal como, en los ensayos descritos en las patentes estadounidenses US nº 6.107.052 y 6.524.808.

La capacidad para producir y aislar grandes cantidades de IMPDH recombinante (por ejemplo, IMPDH que se agrega mínimamente), es importante para el uso en ensayos para el control de niveles de MPA, en pacientes tratados con MMF, o para el uso en ensayos para controlar los niveles en muestras de pacientes de cualquier otro inhibidor de IMPDH terapéuticamente útil. Otros inhibidores de IMPDH, son los que se describen en Anderson, J. H. *et al.*, J. Biol. Chem. 242:4762-4768 (1968) y en las patentes estadounidenses US nº 5.380.879, US nº 5.444.072 y US nº 5.807.876, y en las publicaciones de documentos de prioridad PCT correspondientes a las patentes internacionales WO 94/01 105 y WO 94/12 184.

La patente internacional WO 01/85 952, da a conocer un polipéptido modificado de IMPDH, en donde, el subdominio total, es decir, aproximadamente 130 aminoácidos desde el residuo 111 a 243, se ha reemplazado mediante un tripéptido. Así, de este modo, el subdominio en su totalidad, se ha eliminado, de tal forma que, la estructura total de la IMPDH, se ha modificado a una extensión considerable. La patente internacional WO 01/85 952, no dice nada con relación a la adición de una tag de afinidad y su efecto en la estabilidad de la enzima.

# ES 2 322 477 T3

La capacidad para producir y para aislar grandes cantidades de IMPDH recombinante, estable, es también importante para otras aplicaciones clínicas y de investigación, tales como la identificación y diseño de nuevos inhibidores de IMPDH de utilidad para las terapias contra el cáncer e inmunodepresoras, y para determinar la sensibilidad de la IMPDH a tales tipos de inhibidores.

5 La presente invención, está dirigida a polipéptidos recombinantes, modificados, de IMPDH, y a moléculas de ácido nucleico, modificadas, aisladas, que codifican a estos polipéptidos recombinantes, modificados, de IMPDH. La invención, se dirige, también, a un procedimiento, vectores, y células huésped, para producir tal tipo de polipéptido recombinante, modificado, de IMPDH, y a equipos, a modo de "kit", que comprenden el polipéptido modificado de IMPDH. Los polipéptidos modificados de IMPDH, se modifican, para contener una histidina-tag (cola de histidina), para la purificación mediante cromatografía de afinidad con quelato de níquel, y se modifican, también, en la región del subdominio de los polipéptidos, de tal forma que, la tasa de estabilidad de los polipéptidos de IMPDH, modificados, provistos de histidina-tag (colas de histidina del tipo tag) se mantenga de una forma relativa con respecto al polipéptido de IMPDH del tipo salvaje.

10 15 En una forma de presentación, el polipéptido modificado de IMPDH, provisto de histidina-tag (cola de histidina del tipo tag), tiene la secuencia de aminoácidos de la forma que se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 14, 16, 18, 20 ó 22. En otra forma de presentación, uno o más de los aminoácidos en las posiciones 116-250, tal y como se muestra en la SEQ ID NO: 12, se encuentran sustituidos en el polipéptido modificado de IMPDH, provisto de histidina-tag, con un aminoácido negativamente cargada. En todavía otra forma de presentación, uno o más de las aminoácidos cargados, en las posiciones 130, 132, 134, 140, 142, 143, 155, 159, 167, 173, 177, 187, 188, 201, 209, 211, 212, 214, 230, 234, 235, 237, 244, 247, ó 248, tal y como se muestra en la SEQ ID NO: 12, se encuentran sustituidos en el polipéptido modificado de IMPDH, provisto de histidina-tag, con un aminoácido negativamente cargado. En una forma alternativa de presentación, uno o más de las aminoácidos cargados, en las posiciones 130, 132, 134, 140, 25 142, 155, 159, 167, ó 173, tal y como se muestra en la SEQ ID NO: 12, se encuentran sustituidos en el polipéptido modificado de IMPDH, provisto de histidina-tag, con un aminoácido negativamente cargado.

30 Se proporcionan, también, moléculas aisladas de ácido nucleico, que codifican a los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag. Correspondientemente en concordancia, las moléculas aisladas de ácido nucleico que se proporcionan aquí, codifican un polipéptido modificado de IMPDH del tipo I ó II, en donde, el polipéptido modificado de IMPDH, tiene una histidina-tag, y en donde, el subdominio del polipéptido IMPDH, se encuentra modificado, de tal modo que, la tasa de estabilidad del polipéptido modificado de IMPDH, provisto histidina-tag, se mantiene de una forma relativa al polipéptido de IMPDH del tipo salvaje.

35 35 De una forma particular, se contempla una molécula aislada de ácido nucleico, que codifica a un polipéptido modificado de IMPDH, humano, del tipo I ó del tipo II, en donde, el citado polipéptido tiene una histidina-tag, y en donde, uno o más aminoácidos en las posiciones 116 - 250, tal y como se muestra en la SEQ ID NO:12, se encuentran sustituidos con un aminoácido negativamente cargado.

40 45 En una forma de presentación, la molécula aislada de ácido nucleico, puede comprender una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en las SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, y secuencias complementarias de éstas. En otra forma de presentación, se proporcionan moléculas aisladas de ácido nucleico, en donde, las secuencias complementarias de las moléculas aisladas de ácido nucleico, hibridan bajo condiciones estridentes a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos presentadas en las SEQ ID NO:13, 15, 17, 19 ó 21.

50 55 En todavía otra forma de presentación, se proporcionan moléculas aisladas de ácido nucleico, en donde, las secuencias complementarias de las moléculas aisladas de ácido nucleico, hibridan bajo condiciones estridentes, a los nucleótidos 246 - 750 de la secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en las SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21. En todavía otra forma de presentación, se proporcionan moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden los nucleótidos 346 - 750, de una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21. En otra forma de presentación, se proporcionan moléculas aisladas de ácido nucleico, en donde, el polipéptido de IMPDH codificado, comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo consistente en las SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22. En todavía otra forma de presentación, se proporciona un vector que comprende la molécula aislada de ácido nucleico de las SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, ó SEQ ID NO:21, obtenible a partir de *E. coli* H712 y que tienen el número de acceso de la ATCC, PTA-5786, PTA-5782, PTA-5784, PTA-5785, y PTA-5783, respectivamente.

## 60 Descripción resumida de los dibujos

La figura 1, es una representación esquemática de un polipéptido de IMPDH del tipo salvaje, que muestra el núcleo catalítico y regiones de subdominio del polipéptido IMPDH del tipo salvaje. Para las posiciones de aminoácidos realizadas en los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, descritos aquí, en este documento, véanse las figuras 9 A y B, 11 A y B, 13 A y B, 15 A y B, y 17 A y B.

65 La figura 2, muestra un mapa del plásmido pKK117. El promotor T5 y el operón lac (PT5), se encuentran localizados en los nucleótidos 30 - 90, en el pKK117. La secuencia de codificación de la IMPDH II humana, (1545 pares

# ES 2 322 477 T3

de bases), se encuentra localizada en los nucleótidos 141 - 1685, en el plásmido, y se insertó en los sitios MunI y HindIII. La región de subdominio, se denomina “dominio extra”. La región de terminación de transcripción (mBT1/T2), se encuentra localizada en los nucleótidos 1842 - 2268. El gen de resistencia a la ampicilina (AmpR), se encuentra localizado en los nucleótidos 2359-3219). El origen de replicación (ColE1), se encuentra localizado en los nucleótidos 5 3924 -4024, en el pKK117. La secuencia codificadora para la histidina-tag (6 histidinas), se insertó en el nucleótido 144, en el extremo 5' de la secuencia codificadora para la IMPDH humana, del tipo II, del tipo salvaje, después del codón de inicio ATG.

10 La figura 3, muestra las secuencias de nucleótidos de los cebadores de PCR ((+) y (-)), utilizados para incorporar la secuencia codificadora para una histidina-tag, en el extremo 5' de la secuencia codificadora para la IMPDH humana, del tipo II, del tipo salvaje (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2). La figura 3, muestra también las secuencias de nucleótidos de los cebadores de PCR ((+) y (-)), utilizados para mutar, mediante mutagénesis sitio-dirigida, la secuencia de la IMPDH humana, del tipo I y del tipo II, del tipo salvaje, provista de histidina-tag. La secuencia de la IMPDH del tipo II, en regiones de la secuencia codificadora correspondiente a los aminoácidos 130 - 142 (SEQ ID NO:3 y SEQ ID 15 NO:4), 155 - 159 (SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6), y 167 - 173 (SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8).

La figura 4, muestra la secuencia de nucleótidos de la IMPDH humana, del tipo II, del tipo salvaje (SQ ID NO:9).

20 Las figuras 5 A y B, muestran la secuencia de nucleótidos deducida de la IMPDH humana, del tipo II, del tipo salvaje (SQ ID NO:10). El subdominio, se encuentra subrayado.

25 La figura 6, muestra la secuencia de nucleótidos de la IMPDH humana, del tipo II, del tipo salvaje, con una secuencia de codificación para la histidina-tag, incorporada en el extremo 5' de la secuencia codificadora (SEQ ID NO: 11).

Las figuras 7 A y B, muestran la secuencia de aminoácidos deducida de la IMPDH humana, del tipo II, del tipo salvaje, con una histidina-tag incorporada en el extremo amino-terminal del polipéptido (SEQ ID NO:12). El subdominio, se encuentra subrayado y, los aminoácidos que codifican para la histidina-tag, se encuentran en bastardilla.

30 La figura 8, muestra la secuencia de aminoácidos de la IMPDH humana del tipo II Δ 2B + AH clon A (SEQ ID NO:13).

35 Las figuras 9 A y B, muestran la secuencia de aminoácidos deducida de la IMPDH humana del tipo II Δ 2B + AH clon A (SEQ ID NO:14). El subdominio, se encuentra subrayado y, los aminoácidos que codifican a la histidina-tag, y las sustituciones de aminoácidos, en el subdominio, se encuentran en bastardilla.

40 La figura 10, muestra la secuencia de aminoácidos de la IMPDH humana del tipo II (Δ 3 + 1A) + AH clon A (SEQ ID NO:15).

45 Las figuras 11 A y B, muestran la secuencia de aminoácidos deducida de la IMPDH humana del tipo II (Δ 3 + 1A) + AH clon A (SEQ ID NO:16). El subdominio, se encuentra subrayado y, los aminoácidos que codifican a la histidina-tag, y las sustituciones de aminoácidos, en el subdominio, se encuentran en bastardilla.

50 La figura 12, muestra la secuencia de aminoácidos de la IMPDH humana del tipo II Δ 1,2A + AH clon B (SEQ ID NO:17).

55 Las figuras 13 A y B, muestran la secuencia de aminoácidos deducida de la IMPDH humana del tipo II Δ 1,2A + AH clon B (SEQ ID NO:18). El subdominio, se encuentra subrayado y, los aminoácidos que codifican a la histidina-tag, y las sustituciones de aminoácidos, en el subdominio, se encuentran en bastardilla.

50 La figura 14, muestra la secuencia de aminoácidos de la IMPDH humana del tipo II Δ 3B + AH clon B (SEQ ID NO:19).

55 Las figuras 15 A y B, muestran la secuencia de aminoácidos deducida de la IMPDH humana del tipo II Δ 3B + AH clon B (SEQ ID NO:20). El subdominio, se encuentra subrayado y, los aminoácidos que codifican a la histidina-tag, y las sustituciones de aminoácidos, en el subdominio, se encuentran en bastardilla.

60 La figura 16, muestra la secuencia de aminoácidos de la IMPDH humana del tipo II (Δ2 + I A) + AH clon B (SEQ ID NO:21).

65 Las figuras 17 A y B, muestran la secuencia de aminoácidos deducida de la IMPDH humana del tipo II (Δ2 + I A) + AH clon B (SEQ ID NO:22). El subdominio, se encuentra subrayado y, los aminoácidos que codifican a la histidina-tag, y las sustituciones de aminoácidos, en el subdominio, se encuentran en bastardilla.

65 La figura 18, muestra los datos de la tasa de estabilidad (es decir % de actividad remanente de IMPDHA/tiempo) para la IMPDH humana del tipo II, del tipo salvaje, como un porcentaje de la tasa inicial (eje x) versus el día de sometimiento a test de ensayo (eje y). La actividad IMPDH, se sometió a test de ensayo, utilizando un sistema tampón R1 C(1)(▲, □) ó R1 F(+, ✕) y se sometió a test de ensayo a 4°C (▲, +) y a 25°C (□, ✕).

# ES 2 322 477 T3

La figura 19, muestra los datos de la tasa de estabilidad (es decir % de actividad remanente de IMPDHA/tiempo) para la IMPDH humana del tipo II, provista de histidina-tag, como un porcentaje de la tasa inicial (eje x) *versus* el día de sometimiento a test de ensayo (eje y). La actividad IMPDH provista de histidina-tag, se sometió a test de ensayo, utilizando un sistema tampón R1 C(1)(▲, □) ó R1 F(+, ✕) y se sometió a test de ensayo a 4°C (▲, +) y a 25°C (□, ✕).

5 La figura 20, muestra los datos de la tasa de estabilidad (es decir % de actividad remanente de IMPDHA/tiempo) para la IMPDH humana del tipo II, Δ 2B + AH clone A, como un porcentaje de la tasa inicial (eje x) *versus* el día de sometimiento a test de ensayo (eje y). La actividad IMPDH del tipo II, Δ 2B + AH clone A, se sometió a test de ensayo, utilizando un sistema tampón R1 C(1)(▲, □) ó R1 F(+, ✕) y se sometió a test de ensayo a 4°C (▲, +) y a 25°C (□, ✕).

10 La figura 21, muestra los datos de la tasa de estabilidad (es decir % de actividad remanente de IMPDHA/tiempo) para la IMPDH humana del tipo II (Δ3 + 1A) + AH clon A, como un porcentaje de la tasa inicial (eje x) *versus* el día de sometimiento a test de ensayo (eje y). La actividad IMPDH del tipo II (Δ 3 + 1▲) + AH clon A, se sometió a test de ensayo, utilizando un sistema tampón R1 C(1)(▲, □) ó R1 F(+, \*) y se sometió a test de ensayo a 4°C (▲, +) y a 25°C (□, ✕).

15 La figura 22, muestra los datos de la tasa de estabilidad (es decir % de actividad remanente de IMPDHA/tiempo) para la IMPDH humana del tipo II Δ 1,2A + AH clon B, como un porcentaje de la tasa inicial (eje x) *versus* el día de sometimiento a test de ensayo (eje y). La actividad IMPDH del tipo II Δ 1,2A + AH clon B, se sometió a test de ensayo, utilizando un sistema tampón R1 C(1)(▲, □) ó R1 F(+, \*) y se sometió a test de ensayo a 4°C (▲, +) y a 25°C (□, ✕).

20 La figura 23, muestra los datos de la tasa de estabilidad (es decir % de actividad remanente de IMPDHA/tiempo) para la IMPDH humana del tipo II Δ 3B + AH clon B, como un porcentaje de la tasa inicial (eje x) *versus* el día de sometimiento a test de ensayo (eje y). La actividad IMPDH del tipo II Δ 3B + AH clon B, se sometió a test de ensayo, utilizando un sistema tampón R1 C(1)(▲, □) ó R1 F(+, ✕) y se sometió a test de ensayo a 4°C (▲, +) y a 25°C (□, ✕).

25 La figura 24, muestra los datos de la tasa de estabilidad (es decir % de actividad remanente de IMPDHA/tiempo) para la IMPDH humana del tipo II (Δ2 + 1A) + AH clon B, como un porcentaje de la tasa inicial (eje x) *versus* el día de sometimiento a test de ensayo (eje y). La actividad IMPDH del tipo II (Δ 2 + 1A) + 2H clon B, se sometió a test de ensayo, utilizando un sistema tampón R1 C(1)(▲, □) ó R1 F(+, \*) y se sometió a test de ensayo a 4°C (▲, +) y a 25°C (□, ✕).

## Descripción detallada de la invención

30 La presente invención, está dirigida a polipéptidos recombinantes, modificados, de IMPDH, provistos de histidina-tag, y a moléculas de ácido nucleico, modificadas, aisladas, que codifican a estos polipéptidos de IMPDH. La invención, se dirige, también, a un procedimiento, vectores, y células huésped, para producir tal tipo de polipéptido recombinante, modificado, de IMPDH, provisto de histidina-tag, y a equipos, a modo de “kit”, que comprenden el polipéptido modificado de IMPDH. Los polipéptidos modificados de IMPDH, se modifican, para contener una histidina-tag (cola de histidina), para la purificación mediante cromatografía de afinidad con quelato de níquel, y se modifican, 40 también, en la región del subdominio de los polipéptidos (véase la figura 1), de tal forma que, la tasa de estabilidad de los polipéptidos de IMPDH, modificados, provistos de histidina-tag (colas de histidina del tipo tag) se mantenga de una forma relativa con respecto al polipéptido de IMPDH del tipo salvaje.

45 La purificación del la enzima de IMPDH del tipo salvaje, tiene como resultado un reducido rendimiento productivo y una reducida pureza. Correspondientemente en concordancia, se incorpora, a menudo, una tag de afinidad, tal como la 6-histidina-tag, en la IMPDH del tipo salvaje, con objeto de acortar el tiempo de purificación y para incrementar el rendimiento productivo y la pureza. La adición de tal tipo de tag de afinidad, puede tener como resultado una solubilidad y estabilidad decrecidas de la IMPDH en solución. Correspondientemente en concordancia, se procedió a modificar las moléculas de ácido nucleico que codifican a polipéptidos de la IMPDH humana, provista de histidina-tag, mediante mutagénesis sitio-dirigidas, tal y como se describe aquí, en este documento, para codificar sustituciones de aminoácidos en la región del subdominio de los polipéptidos. Estas sustituciones de aminoácidos, tienen como resultado el mantenimiento de la tasa de estabilidad de los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina, 50 con relación a los polipéptidos de IMPDH del tipo salvaje (véanse las páginas 18 - 24).

55 El mantenimiento de la tasa de estabilidad de los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina, con relación a los polipéptidos de IMPDH del tipo salvaje, significa el hecho de que, la tasa estabilidad del polipéptido modificados de IMPDH, provisto de histidina, a una temperatura de 4°C, es por lo menos la correspondiente a un porcentaje del 80% de la tasa de estabilidad del polipéptido de IMPDH del tipo salvaje, por lo menos aproximadamente un 85% de la tasa de estabilidad del polipéptido de IMPDH del tipo salvaje, por lo menos aproximadamente un 95% de la tasa de estabilidad del polipéptido de IMPDH del tipo salvaje, o por lo menos aproximadamente un 95% de la tasa de estabilidad del polipéptido de IMPDH del tipo salvaje.

60 Tal y como se utiliza aquí, el término “polipéptido modificado de IMPDH”, se refiere a un polipéptido de IMPDH que tiene un subdominio de IMPDH (es decir un subdominio interno, no catalítico) del polipéptido de IMPDH del tipo salvaje, modificado mediante la sustitución de por lo menos un aminoácido normalmente presente en el subdominio, con una aminoácido no normalmente presente. Los “polipéptidos modificados de IMPDH”, son funcionalmente catalí-

# ES 2 322 477 T3

ticos, y pueden formar un multímero (por ejemplo un homotetrámetro), el cual es también un “polipéptido modificado de IMPDH” en concordancia con la presente invención. Los “polipéptidos modificados de IMPDH” descritos aquí, en este documento, son típicamente recombinantes, pero pueden ser sintéticos.

5 Tal y como se utiliza aquí, el término “secuencia complementaria”, se refiere a la capacidad de las secuencias de nucleótidos de purina y pirimidina para asociarse a través de enlace de hidrógeno, para formar moléculas de ácido nucleico de doble hebra. La guanina y citosina, adenina y timina, y adenina y uracilo, son complementarias, y  
10 pueden asociarse mediante un enlace de hidrógeno, dando como resultado la formación de moléculas de ácido nucleico de doble hebra, cuando dos moléculas de ácido nucleico, tienen secuencias “complementarias”. Las secuencias complementarias pueden ser secuencias de DNA ó de RNA.

Tal y como se utiliza aquí, en este documento, una molécula de ácido nucleico “aislada”, es una molécula de ácido nucleico, la cual se encuentra substancialmente separada de otras moléculas de ácido nucleico contaminantes que codifican a otros polipéptidos.

15 La letra individual, codifica para los aminoácidos, de la siguiente forma: A = alanina, R = arginina, N = asparagina, D = ácido aspártico, C = cistéfina, Q = glutamina, E = ácido glutámico, G = glicina, H = histidina, I = isoleucina, L = leucina, K = lisina, M = metionina, F = fenilalanina, P = prolina, S = serina, T = treonina, W = triptófano, Y = tirosina, y V = valina.

20 Los polipéptidos de IMPDH del tipo I y II, incluyen al dominio catalítico N-terminal, un subdominio interno no catalítico, y un dominio catalítico C-terminal (véase la figura 1). Los polipéptidos de IMPDH del tipo I y II, de una variedad de especies, pueden encontrarse provistos de histidina-tag, y modificados en la región del subdominio de los polipéptidos, tal y como se describe aquí, en este documento, para producir y aislar, en un alto rendimiento productivo  
25 y una alta pureza, polipéptidos recombinantes de IMPDH, estabilizados, provistos de histidina-tag. La histidina-tag, puede ser de cualquier longitud de utilidad para la purificación de proteínas, mediante cromatografía de afinidad con quelato de níquel.

30 Los polipéptidos de IMPDH del tipo I ó II proporcionados aquí, que se han modificado para contener una histidina-tag y que se han modificado en el subdominio de IMPDH, pueden sustituirse adicionalmente, suprimirse, truncarse, o fusionarse con otros polipéptidos, o combinaciones de éstos, siempre y cuando el polipéptido resultante expreso de IMPDH, o un fragmento de éste, retenga substancialmente la misma actividad IMPDH que la de los polipéptidos de IMPDH modificados, provistos de histidina-tag, ejemplificados aquí. Estos polipéptidos sustituidos, suprimidos, truncados, y fusionados, se consideran como equivalentes de los polipéptidos modificados de IMPDH ejemplificados.

35 “Adicionalmente sustituidos”, significa el hecho de que, el equivalente, difiere en la sustitución de uno o más aminoácidos, con respecto a los polipéptidos de IMPDH descritos aquí, y que la sustitución adicional, puede ser conservadora o no conservadora y, la sustitución adicional, puede ser con un análogo de aminoácido. La sustitución adicional, puede también realizarse para optimizar el nivel de producción del polipéptido modificado de IMPDH,  
40 en una célula huésped procariótica o eucariótica particular (es decir, una variante de uso de codón). La sustitución adicional, puede acontecer, bien ya sea en el subdominio, o bien ya sea en cualquier otra porción del polipéptido de IMPDH (por ejemplo, en el dominio catalítico N-terminal o en el dominio catalítico C-terminal).

45 En una forma de presentación, se proporciona un polipéptido modificado de IMPDH del tipo I ó II. El polipéptido modificado de IMPDH, tiene una histidina-tag y, el subdominio del polipéptido de IMPDH, se encuentra modificado, de tal forma que, la tasa de estabilidad del polipéptido modificado de IMPDH provisto de histidina-tag, se mantiene de una forma relativa al polipéptido de IMPDH del tipo salvaje. En otras formas de presentación, el polipéptido modificado de IMPDH, tiene la secuencia de aminoácidos de la forma que se muestra en una de las SEQ ID NOS:  
50 14, 16, 18, 20, ó 22. En la forma de presentación que se presenta en la SEQ ID NO:14, cada una de las argininas en las posiciones 155 a 159 (véase la SEQ ID NO:12), se encuentran sustituidas con un ácido glutámico SEQ ID NO:14, posiciones 155 a 159). En la forma de presentación que se muestra en la SEQ ID NO:16, la arginina en la posición 167, la lisina en la posición 173, y la valina en la posición 390 (véase la SEQ ID NO:12), se encuentran sustituidas con un ácido glutámico, un ácido glutámico, y ácido aspártico, respectivamente (SEQ ID NO:16 posiciones 167, 173 y 390). En la forma de presentación que se presenta en la SEQ ID NO:18, la lisina en la posición 140 y la arginina en la posición 142 (véase la SEQ ID NO:12), se encuentran sustituidas con un ácido glutámico (SEQ ID NO:18, posiciones 140 y 142). En la forma de presentación que se muestra en la figura 20, la arginina en la posición 167 y la lisina en la posición 173 (véase la SEQ ID NO:12), se encuentran sustituidas con un ácido glutámico (SEQ ID NO:20 posiciones 167 y 173). En la forma de presentación que se presenta en la SEQ ID NO:22, la lisina en la posición 130, la arginina en la posición 132, la arginina en la posición 134, la lisina en la posición 140, la arginina en la posición 142, la arginina en la posición 144, la arginina en la posición 155, y la arginina en la posición 139 (véase la SEQ ID NO:12), se encuentran cada una de ellas sustituidas con un ácido glutámico (SEQ ID NO:22, posiciones 130, 132, 134, 140, 142, 155 y 159).

65 En todavía otra forma de presentación, uno o más de los aminoácidos en las posiciones 116-250, tal y como se muestra en la SEQ ID NO:12, se encuentran sustituidos en polipéptido modificado de IMPDH, con un aminoácido negativamente cargado, tal como el ácido aspártico o el ácido glutámico. En todavía otra forma de presentación, uno o más de los aminoácidos positivamente cargados en las posiciones 130, 132, 134, 140, 142, 143, 155, 159, 167, 173, 177, 187, 188, 201, 209, 211, 212, 214, 230, 234, 235, 237, 247, ó 248, tal y como se muestra en la SEQ ID NO:12,

# ES 2 322 477 T3

se encuentran sustituidos, en el polipéptido modificado de IMPDH, con un aminoácido negativamente cargado. En una forma alternativa de presentación, uno o más de los aminoácidos positivamente cargados en las posiciones 130, 132, 134, 140, 142, 155, 159, 167, ó 173, tal y como se muestra en la SEQ ID NO:12, se encuentran sustituidos, en el polipéptido modificado de IMPDH, con un aminoácido negativamente cargado.

5 Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico que codifican a la IMPDH del tipo I ó II, que pueden modificarse en la  
10 región codificadora del subdominio de la IMPDH de las moléculas de ácido nucleico, y que se utilizan para producir polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, incluyen a los ácidos de nucleicos que codifican a la IMPDH procedente de una fuente humana, o de otras fuentes de mamíferos, o fuentes bacterianas, fúngicas, de levaduras o de plantas. Cualquier otro tipo de molécula de ácido nucleico que codifica a la IMPDH del tipo I ó II,  
15 procedente de una fuente eucariótica o procariótica, puede utilizarse para producir polipéptidos de IMPDH del tipo I ó II, provistos de histidina-tag, modificados en la región de subdominio, de tal forma que se mantenga la tasa de estabilidad de los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, con relación al polipéptido de IMPDH del tipo salvaje.

20 En una forma de presentación, pueden las moléculas de ácido nucleico obtenidas, por ejemplo, a partir de microorganismos aislados, tales como las bacterias, hongos, o levadura, que exhiban una particularmente alta actividad IMPDH. En otra forma de presentación, la molécula de ácido nucleico expresada de IMPDH, puede ser una molécula heteróloga de ácido nucleico y, en todavía otra forma de presentación, la molécula expresada de ácido nucleico de  
25 IMPDH, puede ser una molécula homóloga de ácido nucleico. Una molécula heteróloga de ácido nucleico, se define, aquí, como una molécula de ácido nucleico que se origina a partir de una especie diferente que la especie utilizada para la expresión de la molécula de ácido nucleico. Una molécula homóloga de ácido nucleico, se define, aquí, como una molécula de ácido nucleico que se origina a partir de la misma especie utilizada para la expresión de la molécula de ácido nucleico.

30 25 Los ejemplos de secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos de la IMPDH que pueden utilizarse, se describen en Natsumeda *et al.*, J. Biol. Chem. 265:5292-5295 (1990), Collart, F. R. y Hubermann, E., J. Biol. Chem. 263:15769-15772 (1988), patente estadounidense US nº 5.665.583, Gu *et al.*, J. Biol. Chem. 272:4458-4456 (1997), Dayton *et al.*, J. Immunol. 152:984 (1994), Zimmermann *et al.*, J. Biol. Chem. 270:6808-6814 (1995), y Glesne *et al.*, Biochem. And Biophys. Res. Comm. 537-544 (1994).

35 Las moléculas de ácido nucleico que codifican a la IMPDH del tipo I ó II que se han modificado para contener la secuencia para una histidina-tag, y que se han modificado en la región de subdominio que codifica a la IMPDH de las moléculas de ácido nucleico que se encuentran adicionalmente sustituidas, suprimidas, truncadas y/o fusionadas con otras moléculas de ácido nucleico, en donde, el polipéptido de IMPDH resultante, expresado, o un fragmento de éste, retiene substancialmente la misma actividad IMPDH que la de los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, se consideran equivalentes de los polipéptidos modificados de IMPDH provistos de IMPDH.

40 45 También, en el ámbito de la presente invención, se encuentran moléculas de ácido nucleico complementarias a las moléculas de ácido nucleico que codifican a los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, descritos aquí, y también aquéllos que hibridan a las moléculas de ácido nucleico complementarias, bajo condiciones astringentes. Las condiciones astringentes típicas, incluyen, por ejemplo, a la hibridación a una temperatura de 55°C a 65°C, en 5X SSPE y 50% formamida, y el lavado una temperatura de 55°C a 65°C, en 0,5X SSPE y 50%, ó la hibridación a 65°C en 0,1% SDS y 1X SSC. Otras condiciones astringentes, son las que se describen en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3<sup>a</sup> Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).

50 55 Las moléculas de ácido nucleico que codifican a los polipéptidos modificados de IMPDH provistos de histidina-tag descritos aquí, en este documento, pueden ser DNA ó RNA, y pueden ser recombinantes o sintéticos. En una forma de presentación, las moléculas de ácido nucleico, se marcan con un marcador detectable, al como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelato metálico, o una enzima, y se utilizan como sondas. En otra forma de presentación, las moléculas de ácido nucleico descritas aquí, incluyen ácidos nucleicos de polipéptidos (PNAs), o derivados, tales como el tioato de fósforo, triéster fosfórico, amidato de fósforo, y fosfonato de metilo, los cuales se unen específicamente a las DNA ó RNA de hebra de individual (Goodchild, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83:4143-4146 (1986).

60 65 En todavía otra forma de presentación, se aislan las moléculas de ácido nucleico que codifican a los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag. Para aislar las moléculas de ácido nucleico que codifican a los polipéptidos modificados de IMPDH provistos de histidina-tag descritos aquí, en este documento, pueden utilizarse las técnicas conocidas en el arte de la técnica especializada. Tal tipo de técnica, se describe en mayor detalle, abajo, a continuación, y otras técnicas para aislar moléculas de ácido nucleico, se describen por parte de Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3<sup>a</sup> Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001).

70 Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que codifican a los polipéptidos modificados de IMPDH provistos de histidina-tag, pueden generarse procediendo a aislar un clon de cDNA que codifica a la proteína de IMPD del tipo salvaje. Puede entonces utilizarse tecnología de DNA recombinante, para modificar la secuencia de cDNA para codificar las sustituciones de aminoácidos en el subdominio de la IMPDH, y para incorporar la secuencia de codificación para una histidina-tag, por ejemplo, en el extremo 5' de la secuencia de codificación de IMPDH. La modificación de la secuencia de cDNA, puede realizarse, por ejemplo, procediendo a utilizar PCR de mutagénesis sitio-dirigida, para

# ES 2 322 477 T3

modificar la secuencia de DNA, para codificar las sustituciones de aminoácidos en el subdominio de la IMPDH, o mediante la utilización de PCR, para insertar la secuencia de codificación para una histidina-tag, en el extremo 5' de la secuencia de codificación de la IMPDH (véase la patente estadounidense US n° 4.603.102).

5 Se procedió a utilizar técnicas similares, para aislar las moléculas de ácido nucleico que codifican a los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, descritos aquí, en este documento. Los cebadores de PCR que tienen las secuencias correspondientes a las SEQ ID NOS: 1 y 2 (véase la figura 3), son los que se utilizaron para insertar la secuencia de codificación para una histidina-tag, en el extremo 5' de la secuencia codificadora de la IMPDH humana del tipo II, del tipo salvaje, en el plásmido pKK117 (véase la figura 2). Se utilizaron los cebadores de PCR  
10 que tienen las secuencias correspondientes a las SEQ ID NOS: 3-8 (véase la figura 3), para modificar la secuencia de IMPDH humana del tipo II, en el pKK117, que tiene la secuencia de codificación para una histidina-tag, en el extremo 5', para producir moléculas de ácido nucleico que codifican a los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, descritos aquí, en este documento (es decir con las sustituciones de aminoácidos en el subdominio de la IMPDH).

15 Las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos de IMPDH modificados, provistos de IMPDH, resultantes, se denominan Δ2B + AH clon A, ( $\Delta 3 + 1A$ ) + AH clon A,  $\Delta 1,2A + AH$  clon B,  $\Delta 3B + AH$  clon B y ( $\Delta 2 + 1A$ ) + AH clon B. Estos clones, tienen las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEQ ID NOS: 13, 15, 17, 19, y 21, respectivamente (véanse las figuras 8, 10, 12, 14 y 16), y las secuencias de aminoácidos deducidas mostradas en las  
20 SEQ ID NOS: 14, 16, 18, 20 y 22, respectivamente (véanse la figuras 9 A y B, 11 A y B, 13 A y B, y 15 A y B). La secuencia codificadora de la IMPDH humana del tipo II, del tipo salvaje, tiene la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO:9 (figura 4), y la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente a la SEQ ID NO:10 (figuras 5 A y B). La secuencia codificadora de la IMPDH humana del tipo II, del tipo salvaje, con una secuencia de codificación para una histidina-tag incorporada en el extremo 5' de la molécula, tiene la secuencia de nucleótidos correspondiente  
25 a la SEQ ID NO:11 (figura 6), y la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente a la SEQ ID NO:12 (figuras 7 A y B).

30 Todas las moléculas de ácido nucleico que codifican a las IMPDH modificadas, provistas de histidina-tag, y a las IMPDH modificadas, provistas de histidina-tag, del tipo salvaje, se depositaron en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Va. Cada una de estas moléculas de ácido nucleico, se insertó en el pKK117, y el vector con inserto, se transformó en la *E. coli* H712. Los clones que contienen el DNA de la IMPDH humana del tipo II, del tipo salvaje, con una secuencia codificadora para una histidina-tag incorporada en el extremo 5' de la molécula, y los clones denominados Δ2B + AH clon A, ( $\Delta 3 + 1A$ ) + AH clon A,  $\Delta 1,2A + AH$  clon B,  $\Delta 3B + AH$  clon B y ( $\Delta 2 + 1A$ ) + AH clon B, tienen los números de acceso de la TCC, de PTA-5787, PTA-5786, PTA 5782,  
35 PTA-5784, PTA-5785, y PTA-5783, respectivamente.

40 Así, de este modo, se proporciona una molécula aislada de ácido nucleico. Las molécula aislada de ácido nucleico, codifica a un polipéptido modificado de IMPDH del tipo I ó II, en donde, el polipéptido de IMPDH, tiene una histidina tag, y en donde, el subdominio del polipéptido de IMPH, se encuentra modificado, de tal forma que, la tasa de estabilidad del polipéptido modificado de IMPDH, provisto de histidina-tag, se mantiene de una forma relativa al polipéptido de IMPDH del tipo salvaje. En una forma de presentación, la molécula aislada de ácido nucleico, puede comprender una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en la SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, y la SEQ ID NO:21, y secuencias complementarias de éstas. En otra forma de presentación, se proporcionan moléculas aisladas de ácido nucleico, en donde, las secuencias complementarias del ácido nucleico aisladas, hibridan bajo condiciones astringentes, a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos presentadas en la  
45 SEQ ID NO:13, 15, 17, 19 ó 21.

50 En todavía otra forma de presentación, se proporcionan moléculas aisladas de ácido nucleico, en donde, las secuencias complementarias de las moléculas aisladas de ácido nucleico, hibridan bajo condiciones astringentes, a los nucleótidos 346 - 750 de una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en la SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19: y la SEQ ID NO:21. En todavía otra forma de presentación, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que comprenden los nucleótidos 346 - 750 de una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en la SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19: y la SEQ ID NO:21. En todavía otra forma de presentación, se proporcionan moléculas de ácido nucleico, en donde, el polipéptido de IMPDH  
55 codificado, comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo consistente en la SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO:22. En todavía otra forma de presentación, se proporciona un vector que comprende la molécula aislada de ácido nucleico de la SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO:21, obtenible de *E. coli* H712, que tiene los números de acceso de la TCC, de PTA-5786, PTA 5782, PTA-5784, PTA-5785, y PTA-5783, respectivamente.

60 Para la expresión de los polipéptidos de IMPDH modificados, provistos de histidina-tag, descritos aquí, en este documento, puede utilizarse cualquier vector de célula huésped procariótico o eucariótico conocido por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica. Así, por ejemplo, puede utilizarse un sistema en donde, el vector se replica autónomicamente o se integra en el genoma huésped. El término vector, incluye, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los plásmidos, cósmidos, fago, fagomidos, y vectores víricos modificados. Los ejemplos ilustrativos de vectores de expresión procariótica, son BLUESCRIPT (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke, et al., J. Biol. Chem. 264:5503-5508 (1989), que se incorpora aquí, en este documento, a título de referencia), el pET24a, para la expresión en *E. coli* (Novagem, Inc. Madison, Wisconsin), y el pKK117, descrito aquí, en este documento. Un

# ES 2 322 477 T3

ejemplo ilustrativo de un vector de expresión eucariota, es un vector de expresión de adenovirus para la expresión en células eucarióticas (Logan, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3665-59 (1984).

En una forma de presentación, el vector, tiene sitios de restricción de segmentación de endonucleasa, para la inserción de moléculas de ácido nucleico, y marcadores genéticos, para la selección de transformantes de células huésped (por ejemplo, marcadores de resistencia a la ampicilina, tetraciclina, canamicina). En un vector de expresión, la molécula de ácido nucleico que codifica a la IMPDH, puede encontrarse unida de una forma operativa a un promotor capaz de dirigir la expresión del polipéptido de IMPDH, en un sistema de vectores de células huésped. Los ejemplos de promotores de procarióticos, incluyen a los promotores constitutivos (por ejemplo, el promotor de la 3-fosfogliceratoquinasa del promotor del factor  $\alpha$ ), y promotores inducibles (por ejemplo, los ADH1, GAL-1-10, GAL 7, PHO5, T7, T5, ó promotor de metalotionina) y puede utilizarse una combinación de promotor-operador, para regular la transcripción.

Los promotores eucarióticos a título de ejemplo, incluyen al promotor de CMV, promotor de ASV, promotor de RSV-LTR, promotor de MMTV-LTR, los promotores tempranos y tardíos de SV40, otros promotores víricos, promotores para la síntesis de enzimas glicolíticas, y al promotor de hMTII. En otra forma de presentación, se encuentran también presentes las secuencias de sitios de unión de ribosomas. Otros sistemas de promotores, son los que se describen por parte de Chang *et al.* en Nature 198:1056 (1977), Goeddel *et al.* en Nucleic Acids Res. 8:4057 (1980), y Shimatake, *et al.* en Nature 292:128 (1981).

Los vectores, puede incluir otras secuencias de control usualmente utilizadas. Por ejemplo, en una forma de presentación, el ácido nucleico que codifica para la IMPDH, tiene una secuencia de terminación para la terminación de la transcripción (por ejemplo, terminación rrn BT1/T2 ó HSP150). En otra forma de presentación, la molécula de ácido nucleico que codifica a la IMPDH, está cortada y empalmada en el marco, con un elemento de mejora transcripcional. Los vectores, pueden también incluir orígenes bacterianos de replicación (por ejemplo, ColEI), de tal forma que, los vectores, puedan replicarse en bacterias, para la fácil producción de DNA, y puedan incluir secuencias para estabilizar el RNA mensajero.

Las células huésped mensajero, incluyen la expresión en bacterias gram positivas o gram negativas. Los ejemplos de células huésped eucarióticas, incluyen a cualquier célula de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, NIH/3T3, HeLa, Daudi, 293, 293-EBNA y VERO), bien ya sea primaria o inmortalizada, células de levaduras, tales como la *S. cerevisiae*, *S. pombe*, y *P. pastoris*, y células de insectos, tales como las células S19 (Smith *et al.*, J. Virol, 46:584 (1983), Engelhard, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:3224-7 (1994), y patente estadounidense U.S. nº 4.215.051, incorporadas todas ellas, aquí, a título de referencia), y células fúngicas (por ejemplo, Trichoderma). Las células huésped eucarióticas, pueden elegirse para asegurar una modificación post-transcripcional correcta de las proteínas. Se describen varios sistemas de células de vectores, en la patente estadounidense U.S. nº 6.4651.572 y en la publicación del documento de prioridad PCT de la patente internacional correspondiente a la publicación nº WO 01/36 607 A1.

En otra forma de presentación, un sistema de vectores de células huésped para expresar los polipéptidos modificados provistos de histidina-tag, es el sistema vector pKK117-*E.coli* H/12, descrito aquí, en este documento. La figura 2, muestra un mapa del plásmido pKK117. El pKK117, contiene el promotor T5 y operón lac (PT5) y estas secuencias de regulación, se encuentran localizadas en los nucleótidos 30-90, en el pKK117. La secuencia de codificación de la IMPDH II humana (SEQ ID NO:9; 1545 pares de bases), se insertó en los nucleótidos 141-1685 en el plásmido. En los nucleótidos 1842-2268, se encuentra localizada una región de terminación de transcripción (mBT1/T2) y, en los nucleótidos 2359-3219, se encuentra localizada un gen de resistencia a la ampicilina (AmpR). En los nucleótidos 3924 - 4024, se encuentra localizado un origen de replicón (Co1E1, para la replicación de pKK117 en bacterias. La secuencia de codificación para la histidina-tag (SEQ ID NO:1; 6 histidinas), se insertó en el nucleótido 144, en pKK117, en el extremo 5' de la secuencia de codificación de la IMPDH humana, del tipo II, del tipo salvaje, después del codón de inicio ATG. En los ejemplos que se describen aquí, en este documento, se realizó la mutagénesis sitio-dirigida utilizando PCR (véanse las SEQ ID NOS:3-8 para la secuencia de los cebadores de PCY), en el pk117 que contenía la secuencia de codificación para el polipéptido de la IMPDH del tipo salvaje, provisto de histidina-tag.

En una forma de presentación, se proporcionan las células huésped que comprenden las moléculas de ácido nucleico descritas aquí, en este documento. La célula huésped, puede seleccionarse de entre el grupo consistente en una bacteria, una levadura, una célula de mamíferos, una célula fúngica, y una célula de insectos. Las células huésped, comprenden un vector, plásmido, fagomido, o cósmido, que comprenden las moléculas de ácido nucleico descritas aquí, en este documento, que codifican a los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, o fragmentos de éstos. En otra forma de presentación, se proporciona un vector que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas aquí, en este documento, que codifican a los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, o fragmentos de éstos.

Las células huésped, pueden transformarse o transfectarse con una construcción de vector que comprenda la molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido modificado de IMPDH, provisto de histidina-tag, utilizando cualquier procedimiento de transformación o de transfección conocido por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica. Tales tipos de procedimientos, incluyen a la electroporación, transformación de protoplastos, microinyección, transfección mediatisada por virus, transfección mediatisada por CaPO<sub>4</sub>, transfección mediatisada por DEAE-dextrano, lipofección, y shock de CaCl<sub>2</sub>. Para otros procedimientos de transformación y transfección y otras técnicas de clonación conocidas en el arte especializado de la técnica, véase Sambrook *et al.*, " Molecular Clo-

ning: A Laboratory Manual”, - Clonación molecular: Un manual de laboratorio -, 3<sup>a</sup> Edición, Cold Springer Harbor Laboratory Press, (2001). Las condiciones de crecimiento para las células procarióticas o eucarióticas transformadas o transfectadas, son conocidas, en el arte especializado de la técnica.

- 5 Las células huésped con las moléculas de ácido nucleico que codifica al polipéptido modificado de IMPDH, provisto de histidina-tag, puede identificarse mediante técnicas que se conocen bien en el arte especializado de la técnica. Así, por ejemplo, las células huésped bacterianas de la molécula de ácido nucleico que codifica al polipéptido modificado de IMPDH provisto de histidina-tag, pueden clonarse, para producir colonias individuales. Las colonias individuales, 10 pueden cultivarse y, las células huésped bacterianas en el cultivo, pueden lisarse, por ejemplo, mediante sonificación (sometimiento a ultra-sonidos), calor, o tratamiento químico, tal como con lizosoma o un detergente, para liberar el DNA, y puede centrifugarse el homogenato, para retirar los residuos de células. El DNA, puede aislar utilizando la técnica descrita en mayor detalle posteriormente, abajo, o procediendo a utilizar cualquier otra técnica conocida en el arte especializado de la técnica. El DNA aislado, puede determinarse mediante técnicas conocidas en el arte especializado de la técnica, tal como el análisis de enzimas de restricción, o la secuenciación, para determinar si el 15 DNA contiene un inserto que codifica para el deseado polipéptido modificado de IMPDH, provisto de histidina-tag. La bacteria que contiene DNA que codifica para el polipéptido modificado de IMPDH, provisto de histidina-tag, puede cultivarse, a continuación, para expresar polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag.

20 Para la expresión de los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, se procede a cultivar células huésped, bajo condiciones apropiadas para la expresión, tales como las que se describen en mayor detalle, 25 posteriormente, abajo. A continuación, se procede a lisar las células cultivadas, por ejemplo, mediante sonificación (tratamiento a ultrasonidos), calor, o tratamiento químico, tal como con lizosima o con un detergente, para liberar el polipéptido expreso, y se centrifuga el homogenato, para retirar los residuos de células. La expresión de los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, pueden detectarse mediante procedimientos conocidos en el arte especializado de la técnica. Así, por ejemplo, los polipéptidos modificados de IMPDH, pueden detectarse mediante marcaje de tinción con Coomassie de geles de SDS-PAGE, inmunotransferencia en la que se utiliza anticuerpos que enlanzan a la IMPDH, o mediante ensayos de la actividad IMPDH.

30 Los polipéptidos modificados de IMPDH de provistos de histidina-tag, y los polipéptidos de IMPDH del tipo salvaje, provistos de histidina-tag, pueden purificarse mediante cromatografía de afinidad de quelato de níquel, tal y como se describe posteriormente, abajo, bien ya sea solamente con ella, o bien ya sea en combinación con otras técnicas convencionales de purificación. Tales técnicas de purificación, incluyen a la precipitación con sulfato amónico, la filtración en gel, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía en columna de DEAE-Sefarosa, cromatografía de afinidad, tal como la consistente en la utilización de anticuerpos IMPDH ó anti-IMPDH, extracción con disolvente-disolvente, ultrafiltración, y HPLC. La histidina-tag, puede también retirarse a continuación de la cromatografía de afinidad con quelato de níquel, mediante procedimientos basados en enzimas que son conocidos en el arte especializado de la técnica, tal como la segmentación de enterokinasa y, los polipéptidos modificados de IMPDH, pueden purificarse a partir de la tag liberada, utilizando cualquiera de las técnicas convencionales anteriormente descritas, 35 arriba. En las formas ilustrativas de presentación, purificación, significa por lo menos aproximadamente un 60% puro, por lo menos aproximadamente un 70-80% puro, por lo menos aproximadamente un 90% puro, o por lo menos aproximadamente un 95% puro. Para técnicas de purificación adicionales que pueden utilizarse, véase R. Scopes, “Protein Purification, Principles and Practice”, - “Purificación de proteínas; Principios y práctica” -, 3<sup>a</sup> Edición, Springer-Verlag (1994). Debe entenderse el hecho de que, los procedimientos de purificación descritos anteriormente, arriba, para la 40 purificación de polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, o para la purificación de polipéptidos de IMPDH del tipos salvaje, provistos de histidina-tag, no son limitativos, y pueden utilizarse cualesquier técnicas de purificación conocidas por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, para purificar los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, o para purificar los polipéptidos de IMPDH del tipos salvaje, provistos de histidina-tag. Los polipéptidos de IMPDH, pueden concentrarse, en caso necesario, mediante técnicas tales como por ejemplo, las de ultrafiltración y filtración de flujo tangencial.

45 Así, de este modo, en una forma de presentación, se proporciona un procedimiento para producir los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina, descritos aquí, en este documento. El procedimiento, comprende la etapa de cultivar la célula huésped transformada con una molécula de ácido nucleico que codifica al polipéptido modificado de IMPDH, provisto de histidina-tag. La célula huésped transformada, se cultiva bajo condiciones apropiadas, para producir el polipéptido modificado de IMPDH, provisto de histidina-tag. El procedimiento, comprende adicionalmente la etapa de recuperación, tal y como se describe anteriormente, arriba, del polipéptido modificado de IMPDH, provisto de histidina, expreso en la célula huésped transformada. Se proporciona, también, un polipéptido modificado de IMPDH, producido mediante este procedimiento.

50 La actividad de los polipéptidos modificados de IMPDH del tipo salvaje, de los polipéptidos modificados de IMPDH del tipo salvaje provistos de histidina-tag, y de los polipéptidos modificados de IMPDH provistos de histidina-tag, puede ensayarse, utilizando métodos *in vitro* descritos aquí, en este documento, o mediante métodos conocidos en el arte especializado de la técnica, tal como los métodos descritos en Carr, *et al.*, J. Biol. Chem. 268:27286-27290 (1993) y Xiang *et al.*, J. Biol. Chem. 271:1425-1440 (1996). Así, por ejemplo, la actividad de los polipéptidos modificados de IMPDH del tipo salvaje, de los polipéptidos modificados de IMPDH del tipo salvaje provistos de histidina-tag, y de los polipéptidos modificados de IMPDH provistos de histidina-tag, puede ensayarse mediante mediciones espectrométricas, a 340 nm. En tal tipo de ensayo, se procede a medir la carga en absorbancia, a 340 nm de NADH por unidad de tiempo, y la carga en absorbancia de NADH, refleja la tasa de formación de NADH mediante IMPDH.

# ES 2 322 477 T3

En otra forma de presentación, la actividad de los polipéptidos de IMPDH, puede ensayarse procediendo a medir la producción de XMD y NAD, a partir de IMPD y NAD, utilizando HPLC y ensayos espectrométricos (véase Montero, C. et al., Clinica Chemica Acta 238:169-178 (1995)).

- 5 Pueden prepararse varias formulaciones de los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag. Los polipéptidos modificados de IMPDH, puede formularse, por ejemplo, como materias en polvo o líquidos, mediante procedimientos conocidos. Las enzimas de IMPDH, pueden añadirse a soluciones tampón, y pueden estabilizarse mediante la adición de agentes químicos (por ejemplo, glicerina, polietielenglicol, EDTA, otras proteínas, detergentes y por el estilo). Los polipéptidos modificados de IMPDH, pueden almacenarse a una temperatura de 4°C, ó pueden  
10 congelarse para el almacenaje, o pueden liofilizarse.

En una forma de presentación, se proporcionan equipos, a modo de "kits", de utilidad para medir la concentración de un inhibidor de IMPDH, u otro analito, en una muestra. El inhibidor de IMPDH, puede ser un fármaco, un derivado de fármaco, una hormona, un polipéptido, un oligonucleótido, o por el estilo. Los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, son un componente de estos equipos a modo de "Kit", para su uso en ensayos tales como que se describen en las patentes estadounidenses U.S. nº 6.107.052 y U.S. nº 6.524.808. En resumen, en estos ensayos, se procede a analizar una muestra, tal como por ejemplo de orina, sangre entera, plasma, suero, saliva, semen, heces, esputo, fluido cerebral espinal, lágrimas, mocos o por el estilo, con objeto de determinar los niveles de un inhibidor de IMPDH, o un metabolito del inhibidor, u otro analito, en la muestra.  
15

- 20 En este ensayo, se procede a medir el cambio en absorbancia, a 340 nm de NADH, por unidad de tiempo, y el cambio en la absorbancia de NADH, refleja la tasa de formación de NADH. El MPA u otro inhibidor de IMPDH, u otro analito, puede inhibir la formación de NADH y, así, de este modo, la concentración de MPA, un metabolito de MPA, u otro inhibidor de IMPDH, en una muestra, es inversamente proporcional a la absorbancia de NADH a 340 nm.  
25 Correspondientemente en concordancia, puede determinarse el nivel de un inhibidor de IMPDH (por ejemplo MPA) u otro analito, en una muestra, utilizando tal tipo de ensayo.

El equipo a modo de "kit", puede contener el polipéptido modificado de IMPDH, provisto de histidina-tag, un substrato de IMP, y NAS. Los IMPDH, IMPD y NAD, se combinan, usualmente, con un tampón apropiado y otros materiales y, a continuación, se envasan. En una forma de presentación, los reactivos, pueden permanecer en forma líquida. En otra forma de presentación, los reactivos, pueden liofilizarse. Puede también incluirse un reactivo de calibración en el equipo a modo de "Kit", significando, un "reactivo de calibración", cualquier material standard o de referencia que contenga una cantidad conocida del inhibidor a ser medido, tal como MPA o sus metabolitos, otro inhibidor de IMPDH, u otro analito. La muestra sospechosa de contener el inhibidor (por ejemplo, MPA), y el reactivo de calibración, se ensayan bajo unas condiciones similares. La concentración de inhibidor, se calcula, a continuación, procediendo a comparar los resultados obtenidos para el espécimen no conocido, con los resultados obtenidos para el standard.  
30  
35

Otros materiales que pueden incluirse en los equipos a modo de "kit" son, por ejemplo, tampones, estabilizantes para el medio de ensayo y los componentes de ensayo, proteínas adicionales, tales como la albúmina, o tensioactivos (surfactantes), de una forma particular, tensioactivos no iónicos, o por el estilo.  
40

Los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag descritos aquí, en este documento, no únicamente pueden utilizarse para controlar los niveles de inhibidores de IMPDH, sino que éstos son también importantes para otras importantes aplicaciones clínicas y de investigación. Así, por ejemplo, los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, pueden utilizarse para la identificación de inhibidores de IMPDH de origen natural, o de otros ligandos de enlace de IMPDH, o para el diseño de inhibidores sintéticos de utilidad para el cáncer y otras terapias inmunosupresoras, y para determinar la sensibilidad de la IMPDH a estos inhibidores.  
45

50 Los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, pueden ser también de utilidad para obtener anticuerpos monoclonales o policlonales, o fragmentos de éstos (como por ejemplo, Fab, F(AB')<sub>2</sub>, fragmentos de Fv, o proteínas de fusión, mediante procedimientos conocidos en el arte especializado de la técnica. En una forma de presentación, pueden producirse anticuerpos humanizados para aplicaciones terapéuticas. En otra forma de presentación, los anticuerpos pueden marcarse con un marcador detectable para su uso, por ejemplo, en ensayos de diagnóstico, o  
55 pueden utilizarse para la purificación de IMPDH.

Los ejemplos que se facilitan a continuación, son para propósitos ilustrativos.

## 60 Formas específicas de presentación

### Ejemplo 1

#### *Modificación de la IMPDH humana del tipo II, del tipo salvaje*

65 Se procedió a clonar la secuencia de la IMPDH humana del tipo salvaje (SEQ ID NO:9), en el PKK117 (también denominado pKK/T7; véase figura 2) en el sitio, mediante técnicas de clonación conocidas en el arte especializado de la técnica. La secuencia de la IMPDH II del tipo salvaje, se modificó, para codificar una 6-histidina-tag, en el extremo

# ES 2 322 477 T3

5' de la secuencia de IMPDH II del tipo salvaje, procediendo a insertar la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:1, en la secuencia de IMPDH II del tipo salvaje, en el pKK117, después del codón de inicio ATG, mediante PCR, utilizando los cebadores que se muestran en la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2. Se procedió a utilizar el equipo a modo de kit de mutagénesis sitio-dirigida, del tipo QuickChance® Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA) y, el 5 diseño de cebadores y el protocolo para la PCR, eran esencialmente de la forma que se describe en el manual de instrucciones para el equipo a modo de kit de mutagénesis sitio-dirigida, del tipo QuickChance® Site-Directed Mutagenesis. Los cebadores, se sintetizaron y purificaron por parte de Commonwealth Biotechnologies, Inc., Richmond, VA.

10 En resumen, el protocolo de la PCR, era de la forma que sigue: Las reacciones de la PCR, contenían 2  $\mu$ l de DNA del pKK117, de doble hebra, con la secuencia de IMPDH II insertada en el plásmido (los 2  $\mu$ l de volumen, contenían 5, 10, 20 ó 50 ng de DNA del plásmido, en tampón TE), 5  $\mu$ l de 10X tampón de reacción, 125 ng de cada cebador en tampón TE ( $\mu$ l de cada uno, 1  $\mu$ l de dNTP mix, y ddH<sub>2</sub>O (37  $\mu$ l). Se procedió a añadir Pfu Turbo- $\Delta$ NA polimerasa (2,5 U/ $\mu$ l; 1  $\mu$ l), con objeto de conseguir un volumen final de 50  $\mu$ l, y cada región, se cubrió con 30  $\mu$ l de aceite mineral. 15 Los parámetros de la ciclación de la temperatura eran, para el segmento 1, un ciclo a 95°C durante 30 segundos y, para el segmento 2, 18 ciclos a 95°C, durante 30 segundos y 68°C durante 12 minutos. Después de la reacción de PCR, las mezclas de reacción, se enfriaron a una temperatura de 4°C. Se realizó, también, un control de la reacción, utilizando el plásmido pWhitescript y cebadores de PCR proporcionados en el equipo a modo de kit de mutagénesis sitio-dirigida, 20 del tipo QuickChance® Site-Directed Mutagenesis.

20 Se procedió, a continuación, a digerir los productos de PCR, con Dpn I, mediante la adición de 1  $\mu$ l de Dpn I, a las mezclas de reacción, procediendo a su adición mediante pipeta, por debajo de la capa superficial de aceite mineral, mezclando las mezclas de reacción e incubando cada mezcla de reacción, a una temperatura de 37°C, durante 25 un transcurso de tiempo de 1 hora, para digerir el DNA plásmido. El DPn I, digiere el DNA plásmido no mutado, maternal, pero no DNA plásmido mutado.

El producto de PCR, es en forma de dsDNA relajado, mellado. Las células supercompetentes XL-1 Blue (proporcionadas con el equipo a modo de kit de mutagénesis sitio-dirigida, del tipo QuickChance® Site-Directed Mutagenesis), pueden recoger el dsDNA relajado, mellado, y puede reparar las mellas. Las células supercompetentes XL-1 30 Blue, se transformaron, con los plásmidos mutados, de la forma que sigue. Las células supercompetentes XL-1 Blue, se enfriaron en hielo, y se mantuvieron a una temperatura de 4°C. Las células supercompetentes, se alicuotaron (50  $\mu$ l), en tubos de propileno preenfriados del tipo Falcon 2059. Se procedió a transferir un alícuoto (1  $\mu$ l) del DNA digerido de Dpn I, procedente de cada muestra y, el tubo de muestra, se transfirió a alícuotas separados de células supercompetentes. Las reacciones de transformación, se mezclaron e incubaron a una temperatura de 4°C, durante un transcurso 35 de tiempo de 30 minutos. Las mezclas de reacción, se calentaron, a continuación, a una temperatura de 42°C, durante un transcurso de tiempo de 45 segundos, y se incubaron en hielo, durante un transcurso de tiempo de 2 minutos. Se procedió a añadir caldo de cultivo NZY (42°C, 0,5 ml), a cada mezcla de reacción y, las reacciones, se incubaron a una temperatura de 37°C, con agitación (225 - 250 revoluciones por minuto), durante un transcurso de tiempo de 1 hora.

40 Las reacciones de transformación, se emplazaron separadamente en placas (250  $\mu$ l), sobre placas de agar de LB, con X-gal e IPTG con  $\mu$ g/ml de ampicilina preparadas según se describe en el manual de instrucciones del equipo a modo de kit de mutagénesis sitio-dirigida, del tipo QuickChance® Site-Directed Mutagenesis. Las placas, se incubaron a un temperatura de 37°C, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 16 horas. Se procedió a escoger colonias 45 individuales y se cultivaron durante el transcurso de toda la noche en caldo de cultivo LB, con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, a una temperatura de 37°C, y mediante agitación a 225 revoluciones por minuto, con objeto de expandir los cultivos. Los cultivos del transcurso de toda una noche, se centrifugaron a 440 x g, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, a las células de granulares, y se descartaron los sobrenadantes.

50 Las bacterias se lisaron y, el DNA plásmido, se aisló a partir de las células XL-1 Blue, utilizando un equipo a modo de kit, del tipo QIAprep® kit (Qiagen, Valencia, CA), en concordancia con las instrucciones de manual del equipo a modo de kit. Se realizaron digestiones de las enzimas de restricción, con objeto de identificar clones, en los cuales 55 se había incorporado la secuencia de codificación para la 6-histidina-tag. Las digestiones (productos de digestión) resultantes, se analizaron utilizando un porcentaje del 4-20% de geles de gradiente de TBE (1,0 mm de espesor; Invitrogen Cat. n° EC 62252) y tampones de ensayo de TBE (Invitrogen Cat. n° LC6678 y LC2675), en concordancia con los procedimientos conocidos en el arte de la técnica especializada. Se utilizaron una escala de 100 pb (Gibco Cat. n° 15628-019) y un equipo, a modo de kit, de marcaje de DNA con plata (Pharmacia Cat. n° 17-6000-30).

60 Se utilizó un protocolo similar al descrito anteriormente, arriba (equipo a modo de kit de mutagénesis sitio-dirigida, del tipo QuickChance® Site-Directed Mutagenesis), para modificar el subdominio de cada uno de los nucleótidos que codifican a la IMPDH modificada, con contenido en histidina-tag, descritos aquí, en este documento (es decir,  $\Delta$ 2B + AH clon A, ( $\Delta$ 3 + 1A) + AH clon A,  $\Delta$  1,2A + AH clon B,  $\Delta$  3B + AH clon B y ( $\Delta$ 2 + 1A) + AH clon B). El DNA utilizado para la PCR, era el DNA plásmido aislado a partir de células XL-1 Blue, utilizando el equipo a modo de kit del tipo QIAprep® kit. La secuencia de la IMPDH II del tipo salvaje que se había modificado para codificar 65 a una 6-histidina-tag en el extremo 5' de la secuencia de IMPDH II, se modificó adicionalmente, en la región de subdominio para cada uno de los clones, mediante PCR (utilizando la secuencia de IMPDH II que se había modificado para codificar a una 6-, en el extremo 5', en el pKK117, y utilizando los cebadores mostrados en las SEQ ID NOS:3 - 8). El protocolo, era tal y como se describe anteriormente, arriba, excepto en cuanto a lo referente al hecho de que,

## ES 2 322 477 T3

los parámetros de la ciclación de la temperatura, para la reacción de PCR, eran, para el segmento 2, 18 ciclos a una temperatura de 95°, durante un transcurso de tiempo de 30 segundos, y 64°C, durante un transcurso de tiempo de 12 minutos.

- 5 Se utilizaron unos protocolos similares a los descritos anteriormente, arriba, incluyendo la transformación de células XL-1 Blue supercompetentes, lisis de las células bacterianas, y aislamiento de DNA, utilizando un equipo a modo de kit, del tipo QIAprep®, para aislar clones positivos para las deseadas modificaciones de la IMPDH, excepto en cuanto a lo referente al hecho de que, los clones positivos, se confirmaron mediante secuenciación realizada por parte de Qiagen, Bothell, WA, en lugar de mediante digestión de enzimas de restricción.

10

### Ejemplo 2

#### *Transformación de *E. coli* H712*

15

- Se procedió a transformar *E. coli* H712 (Yale University), y se utilizó para la expresión de polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina, y para la expresión de polipéptidos provistos de histidina, del tipo salvaje. El DNA utilizado para la transformación de *E. coli* H712, era el DNA plásmido procedente de clones positivos, aislados utilizando el equipo a modo del kit del tipo QIAprep® kit (Qiagen, Valencia, CA) ó el plásmido pKK117, con un inserto que codifica para el polipéptido del tipo salvaje.

20

- Las *E. coli* H712, se hicieron competentes, mediante el procedimiento de Cheng, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:2172 (1989) con modificaciones. En resumen, un cultivo fresco realizado a través de toda una noche de *E. coli* H712 en caldo de cultivo LB, se diluyó a razón de 1:50, en caldo de cultivo LB calentado, a un volumen final de 60 ml. El cultivo, se incubó a una temperatura de 37°C, mediante agitación a 225 revoluciones por minuto, hasta que el cultivo alcanzara una OD<sub>600 nm</sub>, de aproximadamente 0,3 - 0,4. Los 60 ml de cultivo, se centrifugaron durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, a 4100 x g y, el gránulo, se resuspendió en 6 ml de TSS frío (caldo de cultivo LB, 10% PEG (MW 8000), 5% DMSO, 42 mM MgCl<sub>2</sub>). Se prepararon alícuotas de las células resuspendidas (0,1 ml), en crioviales, en un baño de nitrógeno líquido, y las células, se almacenaron a una temperatura de -70°C.

30

- Se procedió a transformar células competentes de *E. coli* H712, de la forma que sigue. Se deshelaron tubos de células competentes, en hielo. Se procedió a añadir un alícuoto de 1 µl de cada plásmido purificado, a tubos separados y, el líquido, se mezcló cuidadosamente. Las mezclas de transformación, se incubaron en hielo, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. Se añadió caldo de cultivo NZYM (0,50 ml), precalentado (42°C) y las células, se sometieron a tratamiento por calor, a una temperatura de 42°C, durante un transcurso de tiempo de 2 minutos. Las células, se volvieron a poner inmediatamente, otra vez, sobre hielo, durante un transcurso de tiempo de 2 minutos. A continuación, se procedió a añadir caldo de cultivo NZYM (0,9 ml) precalentado (37°C) y, el líquido, se agitó cuidadosamente. Las mezclas de transformación, se incubaron a una temperatura de 37°C, con agitación a 225 revoluciones por minuto, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. A continuación, se procedió a extender alícuotas (20 µl) sobre placas de agar (agar LB + 10 µg/ml de ampicilina). Las placas, se incubaron a una temperatura de 37°C, durante el transcurso de toda la noche. Las colonias se seleccionaron, los cultivos se cultivaron durante el transcurso de toda la noche, y se prepararon provisiones de glicerina.

45 Ejemplo 3

#### *Expresión de IMPDH, utilizando *E. coli* H712*

50

- Se procedió a cultivar un cultivo de toda la noche, a partir de provisiones de glicerol congeladas, a una temperatura de 37°C, con agitación. Las células, se cultivaron en caldo de cultivo Terrific + sales de medio mínimo M9, 2% glucosa, y 100 µg/ml de ampicilina. Las células, se diluyeron a un valor de relación de 1:1000, en medio fresco, con IPTG (0,5 mM). Las células, se cultivaron durante un transcurso de tiempo de 22 horas, a una temperatura de 37°C, con agitación. Las células, se recolectaron mediante centrifugación (4100 x g, durante 30 minutos), se lavaron con NaCl al 9%, se centrifugaron otra vez, y se almacenaron a una temperatura de -70°C.

55

- Las células, se deshelaron y lisaron mediante la adición de 4,5 ml de tampón de lisis por gramo de células. El tampón de lisis, era 10 mM Tris Base, 7,5 mM TECP-HCl, inhibidor de proteasa completo exento de EDTA (Roche Diagnostics), a la concentración recomendada, 500 mM KCl, y 10 mM imidazol, pH 8,0). La solución, se mezcló hasta que, el gránulo en su totalidad, se encontrara en solución. A continuación, se procedió a añadir Lysozyme 20.000 U/ml (Epicenter Cat. nº R1810M) y, la solución, se agitó durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. Se añadió Benzonase (1 µl/ml; solución de lisis de Novagen Cat. nº 70746) y, la solución, se agitó durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. A continuación, se añadieron dos partes de tampón de dilución de lisis, por una parte del lisado. El tampón de dilución de lisis, era 20 mM NaPO<sub>4</sub>, 7,5 mM TECP-HCl, 0,5 M KCl, 6,0 urea, 20 mM imidazol, y 0,3% NP-40, pH. El lisado, se mezcló durante un transcurso de tiempo de por lo menos 30 minuto, y se almacenó durante el transcurso de toda la noche, en el frío, a una temperatura de mayor de 4°C. El lisado, se centrifugó a 20.000 x g, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos y, el sobrenadante, se retuvo, se ajustó a un valor pH de 8,0, y se filtró, utilizando un filtro de acetato de celulosa.

# ES 2 322 477 T3

## Ejemplo 4

### *Purificación de IMPDH aislada a partir de E. coli H712*

5 Se procedió a purificar los polipéptidos modificados de IMPDH del tipo salvaje, provistos de histidina-tag y los polipéptidos de IMPDH provistos de histidina-tag, del tipo salvaje, mediante cromatografía de afinidad de quelato de níquel, seguido de la aplicación de la proteína diluida, a una columna de desalación, utilizando procedimientos conocidos en el arte especializado de la técnica.

10 *Cromatografía de afinidad de quelato de níquel*

La resina de níquel, puede obtenerse, por ejemplo, de procedencia de las firmas Pharmacia (columna de XK 26) y Qiagen (Valencia, CA; (Resina de superflujo del tipo Superflow Resin Ni-NTA). Los protocolos de purificación que se facilitan posteriormente, a continuación, son aplicables a las resinas de afinidad de quelato de níquel, procedentes de las firmas Pharmacia o Qiagen. Todos los tampones, se desgasificaron, antes de su utilización.

20 *Tampones*

20 *Tampón de dilución de la muestra*

20 mM NaPO<sub>4</sub>, 7,5 mM TCEP-HCl, 0,5 M KCl, 6 M urea, 0,02 M imidazol, y 0,3% NP-40, pH 8,0.

25 *Tampón de equilibrio/enlace/lavado*

20 mM NaPO<sub>4</sub>, 7,5 mM TCEP-HCl, 0,5 M KCl, 4 M urea, 0,02 M imidazol, y 0,175% NP-40, pH 8,0.

30 *Tampón de lavado (sólo Qiagen)*

20 mM NaPO<sub>4</sub>, 7,5 mM TCEP-HCl, 0,5 M KCl, 0,02 M imidazol, y 0,175% NP-40, pH 8,0.

35 *Tampón de elución A (sólo Quiagen)*

20 mM NaPO<sub>4</sub>, 7,5 mM TCEP-HCl, 0,5 M KCl, 0,05 M imidazol, y 0,175% NP-40, pH 8,0.

40 *Tampón de elución B*

20 mM NaPO<sub>4</sub>, 7,5 mM TCEP-HCl, 0,5 M KCl, 0,1 M imidazol, y 0,175% NP-40, pH 8,0.

45 *Tampón de elución C (sólo Quiagen)*

20 mM NaPO<sub>4</sub>, 7,5 mM TCEP-HCl, 0,5 M KCl, 0,2 M imidazol, y 0,175% NP-40, pH 8,0.

50 *Tampón de elución D (sólo Pharmacia)*

20 mM NaPO<sub>4</sub>, 7,5 mM TCEP-HCl, 0,5 M KCl, 0,02 M imidazol, y 0,175% NP-40, pH 8,0.

55

60

65

# ES 2 322 477 T3

## *Procedimientos de purificación*

5	Etapa	Resina Pharmacia (columna de 100 ml)	Resina de Quiagen (columna de 25 ml)
10	Carga	10 ml/minuto	3 ml/minuto (para no exceder las especificaciones de la presión)
15	Lavado 1	Tampón de equilibrio/enlace/lavado, 10 ml/minuto	Tampón de equilibrio/enlace/lavado, 3 ml/minuto
20	Lavado 2	N/A	Tampón de lavado, sin urea, 3 ml/minuto
25	Elución 1	Tampón de elución B (0,1 M imidazol), 10 ml/minuto	Tampón de elución A (0,05 M imidazol), 3 ml/minuto
30	Elución 2	Tampón de elución D (0,3 M imidazol), 10 ml/minuto	Tampón de elución B (0,1 M imidazol), 3 ml/minuto
35	Etapa	Resina de Pharmacia (columna de 100 ml)	Resina de Quiagen (columna de 25 ml)
40	Elución 3	N/A	Tampón de elución (0,2 M imidazol), 3 ml/minuto
45	producto	Eluidos en 0,3 M imidazol	Eluidos en 0,1 M imidazol

## 50 *Cromatografía de columna de desalación*

### *Materiales*

Columna de desalación HiPrep 26/10, Pharmacia (Cat. N° 17-5087-01).

55

### *Tampón de desalación*

0,437 M TAPSO, 25,8 M acetato potásico, 4,23 mM IMP, 7,5 mM TECP-HCl, 0,2% Suttocide A y 0,175% NP-40, pH 8,0.

### *Procedimiento de desalación*

65 Se procedió a desgasificar todos los tampones, antes de su utilización. La columna de desalación, debe equilibrarse bien y hacerse avanzar (puesta a cero) al tiempo de descarga. Cuando la proteína eluida a partir de la columna de afinidad de quelato de níquel se aplicó a la columna de desalación y, el colector de fracciones, se ajustó para recoger fracciones de 5 ml. Cuando el pico de enzimas se había eluido a partir de la columna, el colector de fracciones, se

# ES 2 322 477 T3

desconectó y, el flujo, se derivó hacia la salida de residuos. Las fracciones pico, se recogieron y se ensayaron. Se observó una cima o un segundo pico, después de la IMPDH eluída, pero no existía actividad en esta cima, y ésta no se extrajo. Las fracciones de las columnas con IMPDH, se identificaron mediante medición de la actividad enzimática en la fracciones, utilizando el ensayo descrito en el ejemplo 5. La IMPDH purificada, se almacenó a una temperatura de 5 4°C ó de -20°C.

## Ejemplo 5

### 10 *Ensayo de la actividad enzimática de IMPDH*

Las fracciones de columna, se ensayaron en cuanto a lo referente a su actividad enzimática, de la forma que sigue a continuación. Se determinó, también, la actividad específica de la IMPDH purificada. La actividad enzimática, combinada con la determinación de la concentración de proteínas, proporciona un medio para determinar la actividad 15 específica de la proteína modificada, lo cual es también una indicación del grado de agregación.

#### *Materiales para el ensayo enzimático*

20 Diluyente: 100 mM TAPSO, 3,1 mM TCEP-HCl, 100 mM KCl, 0,2 mM IMP, pH 8,0.

Tampón de reacción: 100 mM TAPSO, 3,1 mM TCEP-HCl, 10 mM KCl, 0,4 mM NAD, pH 8,0.

#### 25 *Equipo para el ensayo enzimático*

Espectrofotómetro UV/vis spectrophotometer, de temperatura cuidadosamente controlada, con 50 BioSpec.

#### 30 *Procedimiento de ensayo enzimático*

Se procedió a diluir la enzima purificada y a emplazarla en una cubeta, emplazándose, la cubeta, en el interior de un portador de cubetas y, la solución, se equilibró a una temperatura de 37°C. El tampón de reacción de ensayo (990 µl), se añadió a una cubeta por separado y, la cubeta en cuestión, se cubrió y se colocó en el portador de cubetas. La solución, se equilibró a una temperatura de 37°C. Se procedió a añadir muestra calentada (115,55 µl) 35 al tampón de reacción calentado y, la solución, se mezcló mediante inversión y se emplazó de nuevo en el espectrofotómetro. La reacción, se controló inmediatamente, a 340 nm, procediendo a tomar una lectura de absorbancia cada 10 segundos, durante un período de tiempo de 3 minutos. La actividad enzimática, se calculó de la siguiente forma:

$$40 \frac{\Delta \text{ absorbencia}}{6,22} \times \text{factor de dilución} \times \frac{\text{volumen total}}{\text{volumen de muestra}} = \text{total de actividad enzimática}$$

45 Se procedió a analizar los niveles de proteína, utilizando el juego de reactivos de preparación de ensayo de proteínas del tipo Compat-Able® Protein Assay Preparation Reagent Set (Pierce Cat. nº 23215) o el ensayo de proteínas del tipo Protein Assay ELC (Roche Diagnostics Cat. nº 1767003). La actividad específica, se define como la actividad por masa de proteína, y ésta era de aproximadamente 1 unidad/mg, para los polipéptidos modificados de IMPDH II.

## 50 Ejemplo 7

### *Ensayo de tasa de estabilidad de la IMPDH*

55 Se procedió a medir las tasas de estabilidad de las enzimas modificadas de IMPDH, provistas de histidina-tag (figuras 20 - 24), con objeto de comparar la tasa de estabilidad de las enzimas modificadas, provistas de histidina-tag (es decir, modificadas en el subdominio) con la tasa de estabilidad de la enzima de IMPDH, del tipo salvaje, provista de histidina-tag (figura 19). Se procedió, también, a medir la tasa de estabilidad de la enzima del tipo salvaje, sin una "tag" (figura 19). Las tasas de estabilidad, se midieron de la forma que se describe a continuación:

#### *Tampones*

65 R1 C (1): 0,437 M TAPSO, 0,0258 M acetato sódico, 2,35 mM TCEP, 4,32 mM IMP, 0,3 mM EDTA disódica, 0,72 mM fosfato sódico, 10,7 mM KCl, y 0,1% Sutocide A, pH 8,0. Una formulación alternativa del tampón R1 C (1), es la de 0,437 M TAPSO, 25,8 M acetato potásico, 7,5 mM TCEP, 4,32 mM IMP, 0,175 NP40, y 0,2% Sutocide A, pH 8,0.

## ES 2 322 477 T3

R1 F: 0,115 M TAPSO, 0,347 M acetato sódico, 2,35 mM TCEP, 4,32 mM IMP, 3,51 mM EDTA disódica, 0,72 mM fosfato sódico, 10,7 mM KCl, y 0,05% Sutocide A, pH 8,0.

R2: 2,5 mM NAD, 0,0175% NP40, y 0,05% Sutocide A, pH 6,0. Una formulación alternativa de R2, es 0,1 M ACES, 10 mM NAD, 7,5 mM TCEP, 0,175% NP40, y 0,05% Sutocide A, pH 6,0.

ACES = ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico ó ácido N-(carbamoilmetil)-2-aminoetanosulfónico ó N-(carbamoilmetil)taurina ó ácido 2-(carbamoilmetil-amino)-etanosulfónico.

TAPSO = ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-3-amino-2-hidroxi-propanosulfónico ó ácido 2-hidroxi-3-[tris(hidroximetil)metilamino]-1-propanosulfónico.

TCEP = Tris(2-carboxietil)fosfina ó ácido 3,3',3'' -fosfinidin-tripropiónico.

TCEP-HCl = Clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina ó clorhidrato del ácido 3,3',3''-fosfinidin-tripropiónico.

### *Procedimiento de ensayo enzimático*

Los ensayos de tasa de estabilidad, se realizaron a unas temperaturas de 4°C y 37°C. Las tasas, se compararon a la tasa de t = 0,4°C, y se utilizó o bien el tampón R1 C(1) ó bien el R1 F. Los ensayos de tasa de estabilidad, se realizaron en un analizador del tipo Hitachi 917 analyzer, con los siguientes parámetros:

Tasa A, 10 minutos, ventana de lectura 28 - 33.

Longitud de onda primaria: 340 nm.

Longitud de onda secundaria: 700 nm.

Volumen de la muestra: 2  $\mu$ l.

Volumen de R1: 167  $\mu$ l.

Volumen de R2: 33  $\mu$ l.

Tipo de calibración: lengüeta.

Tal y como se ha discutido anteriormente, arriba, se procedió a medir las tasas de estabilidad de las enzimas modificadas de IMPDH, provistas de histidina-tag (figuras 20 - 24), con objeto de comparar la tasa de estabilidad de las enzimas modificadas, provistas de histidina-tag (es decir, modificadas en el subdominio), con la tasa de estabilidad de la enzima de IMPDH, del tipo salvaje, provista de histidina-tag (figura 19). Los resultados representados en las figuras 18 - 24, muestran el hecho de que, la tasa de estabilidad de los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, es aproximadamente igual a de la proteína del tipo salvaje (es decir que, los polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina tag, no exhiben la tasa de estabilidad decrecida observada para los polipéptidos de IMPDH provistos de histidina-tag que no se habían modificado en el subdominio). Correspondientemente en concordancia, la modificación de un polipéptido de IMPDH provisto de histidina-tag, en el subdominio, tal y como se describe aquí, en este documento, tiene como resultado el mantenimiento de la tasa de estabilidad de la enzima, con relación a la enzima de IMPDH del tipo salvaje.

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5        1. Un polipéptido modificado de ionosin-5'-monofosfato deshidrogenasa IMPDH, humano, en donde, el citado polipéptido de IMPDH, tiene una histidina tag y en donde, uno o mas aminoácidos de dicho polipéptido de IMPDH correspondientes a las posiciones 116 - 250, según se muestra en la figura SEQ ID NO:12, se encuentran sustituidos con un aminoácido negativamente cargado.
- 10      2. El polipéptido modificado de IMPDH de la reivindicación 1, en donde, el citado polipéptido modificado de IMPDH, es IMPDH del tipo I ó del tipo II.
- 15      3. El polipéptido modificado de IMPDH de la reivindicación 1, que tiene la secuencia de aminoácidos según se muestra enana cualquiera de las SEQ ID NOS: 14, 16, 18, 20 ó 22.
- 20      4. El polipéptido modificado de IMPDH de la reivindicación 1, en donde, uno o más aminoácidos positivamente cargados en las posiciones 130, 132, 134, 140, 142, 143, 155, 159, 167, 173, 177, 187, 188, 201, 209, 211, 212, 214, 230, 234, 235, 237, 244, 247, ó 248, tal y como se muestra en la SEQ ID NO: 12, se encuentran sustituidos con un aminoácido negativamente cargado.
- 25      5. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico la cual codifica al polipéptido modificado de IMPDH de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30      6. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 5, en donde, la citada célula huésped, se selecciona de entre el grupo consistente en una bacteria, una levadura, una célula de mamífero, una célula fúngica, y una célula de insecto.
- 35      7. Un procedimiento para producir el IMPDH modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, que comprende las etapas de:
- 30      (a) cultivar la célula huésped de la reivindicación 6, bajo unas condiciones apropiadas, para producir el citado polipéptido modificado de IMPDH y
- 35      (b) recuperar el citado polipéptido modificado de IMPDH producido.
- 35      8. El polipéptido modificado de IMPDH, producido mediante el procedimiento de la reivindicación 7.
- 40      9. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica a un polipéptido modificado de IMPDH, humano, del tipo I ó del tipo II, en donde, el citado polipéptido de IMPDH, tiene una histidina tag y, en donde, uno o más aminoácidos del citado polipéptido de IMPDH, correspondientes a las posiciones 116 - 250, tal y como se muestran en la SEQ ID NO:12, se encuentran sustituidas con un aminoácido negativamente cargado.
- 45      10. Las moléculas aisladas de ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde, el citado ácido nucleico, es DNA ó RNA.
- 45      11. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde, la secuencia complementaria de la citada molécula aislada de ácido nucleico, híbrida bajo condiciones astringentes a la secuencia de nucleótidos presentada en las SEQ ID NOS: 13, 15, 17, 19 ó 21.
- 50      12. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 9, que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en la SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, y secuencias complementarias de éstas.
- 55      13. Un vector de expresión que comprende la molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 12, operativamente enlazada a un promotor.
- 55      14. Un vector que comprende la molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 12.
- 55      15. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 14.
- 60      16. La célula huésped de la reivindicación 15, en donde, la citada célula huésped, se selecciona de entre el grupo consistente en una bacteria, una levadura, una célula de mamífero, una célula fúngica, y una célula de insecto.
- 65      17. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde, la secuencia complementaria de la citada molécula aislada de ácido nucleico, híbrida, bajo condiciones astringentes, a los nucleótidos 246 - 750 de una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en la SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21.

## ES 2 322 477 T3

18. Un vector de expresión que comprende la molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 17, operativamente enlazada a un promotor.
19. Un vector que comprende la molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 17.
- 5 20. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 19.
21. La célula huésped de la reivindicación 20, en donde, la citada célula huésped, se selecciona de entre el grupo consistente en una bacteria, una levadura, una célula de mamífero, una célula fúngica, y una célula de insecto.
- 10 22. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde, el citado polipéptido de IMPDH, comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo consistente en la SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22.
- 15 23. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 9, que comprende los nucleótidos 346 - 750 de una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en la SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21.
24. Un vector que comprende la molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 12, obtenible a partir de 20 *E. coli* H712 que tiene los números de acceso de la ATT, PTA-5786, PTA-5782, PTA-5784, PTA-5285 ó PTA 5783.
25. Un equipo, a modo de “kit”, que comprende el polipéptido modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4.

25

30

35

40

45

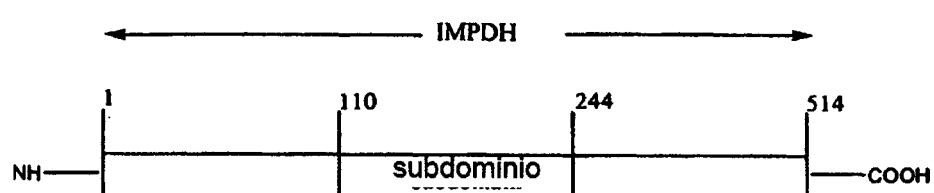
50

55

60

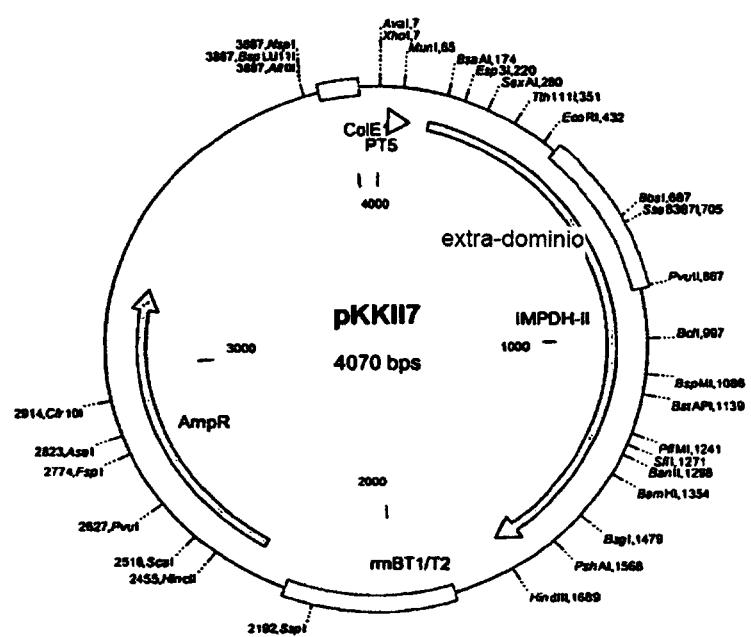
65

**FIGURA 1**



ES 2 322 477 T3

**FIGURA 2**



ES 2 322 477 T3

**FIGURA 3**

5' GGA GAT ATA CAT ATG CAT CAC CAT CAC GAC TAC C 3' (SEQ ID NO:1)

5' GGT AGT CGG CGT GAT GGT GAT GCA TAT GTA TAT CTC C 3' (SEQ ID NO:2)

5' GGT CCT CAG CCC CGA AGA TGA GGT GGA AGA TGT TTT TGA GGC  
CGA AGC CGA GCA TGG TTT CTG C 3' (SEQ ID NO:3)

5' GCA GAA ACC ATG CTC GGC TTC GGC CTC AAA AAC ATC TTC CAC  
CTC ATC TTC GGG GCT GAG GAC C 3' (SEQ ID NO:4)

5' CCA ATC ACA GAC ACA GGC GAA ATG GGG AGC GAG TTG GTG 3' (SEQ ID NO:5)

5' CAC CAA CTC GCT CCC CAT TTC GCC TGT GTC TGT GAT TGG 3' (SEQ ID NO:6)

5' GGC ATC ATC TCC TCC GAA GAC ATT GAT TTT CTC GAG GAG  
GAG GAA C 3' (SEQ ID NO:7)

5' GTT CCT CCT CGA GAA AAT CAA TGT CTT CGG AGG AGA  
TGA TGC C 3' (SEQ ID NO:8)

# ES 2 322 477 T3

## FIGURA 4

atggccgact acctgattag tggggcactg tcctacgtgc cagacgacgg actcacagca	60
cagcagctct tcaactgcgg agacggccctc acctacaatg actttctcat tctccctggg	120
tacatecgact tcactgcaga ccaggtggac ctgacttctg ctctgaccaa gaaaatcact	180
cttaagaccc cactggttc ctctccatg gacacagtca cagaggctgg gatggccata	240
gcaatggcgc ttacaggcgg tattggcttc atccaccaca actgtacacc tgaattccag	300
gccaatgaag ttccggaaagt gaagaaatat gaacaggat tcacacaga ccctgtggc	360
ctcagccccca aggatcgcgt gcgggatgtt ttggggccca aggcccccga tggtttctgc	420
ggtatcccaa tcacagacac agggccggatg gggagccgcg tggggccat catctccctcc	480
agggacattg attttctcaa agaggaggaa catgactgtt tcttggaaaga gataatgaca	540
aagagggaaag acttgggtgt agccctgca ggcacacac tgaaggaggc aaatgaaatt	600
ctgcagcgca gcaagaaggg aaagttgccc attgtaaatg aagatgtga gtttgtggcc	660
atcattgcc ggacagacct gaagaagaat cgggactacc cactagccct caaagatgcc	720
aagaaacagc tgctgtgtgg ggccaggcatt ggcactcatg aggatgacaa gtataggctg	780
gacttgctcg cccaggctgg tggggatgta tgggtttgg actcttccca gggaaattcc	840
atcttccaga tcaatatgat caagtacatc aaagacaaat accctaattct ccaagtcat	900
ggaggcaatg tggtcactgc tgcccaggcc aagaacctca ttgatgcagg tggatgccc	960
ctgcgggtgg gcatggaaag tggctccatc tgcattacgc aggaagtgc tggctgtggg	1020
cggcccccaag caacagcagt gtacaaggatg tcagagtatg cacggcgctt tggatcccg	1080
gtcattgctg atggaggaat ccaaaatgtg ggtcatattg cgaaagcctt ggcccttggg	1140
gcctccacag tcatgtggg ctctctccctg gctgccacca ctgaggcccc tggatgaaat	1200
ttctttccg atggatccg gctaaagaaa tatcgccgtt tgggttctct cgatgcccatt	1260
gacaagcacc tcagcagccca gaacagatat ttcaatgtgaag ctgacaaaat caaatggcc	1320
cagggagtgt ctgggtgtgt gcaggacaaa gggtaatcc acaaattttgt cccttacctg	1380
attgctggca tccaaacactc atgccaggac attgggtggca agagcttgcac ccaagtccga	1440
gccatgtatgt actctggggaa gcttaagttt gagaagagaa ctgcctcagc ccaggtggaa	1500
ggggcgctcc atagectcca ttcaatgtgaag aagcggcttt tctga	1545

ES 2 322 477 T3

**FIGURA 5A**

Met Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Val Pro Asp Asp  
 1 5 10 15

Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys Gly Asp Gly Leu Thr Tyr  
 20 25 30

Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile Asp Phe Thr Ala Asp Gln  
 35 40 45

Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys Ile Thr Leu Lys Thr Pro  
 50 55 60

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

Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe Ile His His Asn Cys Thr  
 85 90 95

Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys Val Lys Lys Tyr Glu Gln  
 100 105 110

Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser Pro Lys Asp Arg Val Arg  
 115 120 125

Asp Val Phe Glu Ala Lys Ala Arg His Gly Phe Cys Gly Ile Pro Ile  
 130 135 140

Thr Asp Thr Gly Arg Met Gly Ser Arg Leu Val Gly Ile Ile Ser Ser  
 145 150 155 160

Arg Asp Ile Asp Phe Leu Lys Glu Glu His Asp Cys Phe Leu Glu  
 165 170 175

Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val Val Ala Pro Ala Gly Ile  
 180 185 190

Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln Arg Ser Lys Lys Gly Lys  
 195 200 205

Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu Val Ala Ile Ile Ala Arg  
 210 215 220

Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro Leu Ala Ser Lys Asp Ala  
 225 230 235 240

Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile Gly Thr His Glu Asp Asp  
 245 250 255

Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala Gly Val Asp Val Val Val  
 260 265 270

Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe Gln Ile Asn Met Ile Lys  
 275 280 285

Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln Val Ile Gly Gly Asn Val  
 290 295 300

ES 2 322 477 T3

**FIGURA 5B**

Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile Asp Ala Gly Val Asp Ala  
305                   310                   315                   320

Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile Cys Ile Thr Gln Glu Val  
325                   330                   335

Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala Val Tyr Lys Val Ser Glu  
340                   345                   350

Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile Ala Asp Gly Gly Ile Gln  
355                   360                   365

Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Ser Thr Val  
370                   375                   380

Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr Glu Ala Pro Gly Glu Tyr  
385                   390                   395                   400

Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys Tyr Arg Gly Met Gly Ser  
405                   410                   415

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

Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly Val Ser Gly Ala Val Gln  
435                   440                   445

Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro Tyr Leu Ile Ala Gly Ile  
450                   455                   460

Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys Ser Leu Thr Gln Val Arg  
465                   470                   475                   480

Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe Glu Lys Arg Thr Ser Ser  
485                   490                   495

Ala Gin Val Glu Gly Val His Ser Leu His Ser Tyr Glu Lys Arg  
500                   505                   510

Leu Phe

# ES 2 322 477 T3

**FIGURA 6**

atgcatacacc	atcacccatca	cgccgactac	ct gattagtg	ggggca cgtc	ctacgtgccs	60
gacgacggac	tcacagcac a	gcagctttc	aa ctgcggag	acggcc tcac	ctacaatgac	120
tttctcattc	tccctgggt a	catacgactc	ac tgcagacc	aggtagg acct	gacttctgct	180
ccgaccaaga	aaatcacct t	taagacccc a	ct ggtttcct	ctccca tgga	cacagt caca	240
gaggctggga	tggccatag c	aatggcgctt	ac aggccgta	ttaggct tcat	ccaccacaac	300
tgtacacctg	aatccaggc	caatgaagtt	cg gaaaatgt	gaaat atga	acagggattc	360
atcscagacc	ctgtggctt	cagccccaaag	ga tcgcgtgc	gggatg tttt	tgaggccaag	420
gccccggcatg	gtttctgccc	tatcccaatc	ac agacacag	gccgga tggg	gagccgcttg	480
gtgggcatca	tctcctccag	ggacattgtat	tt tctcaaag	aggagg aaca	tgactgtttc	540
ttggaaagaga	taatgacaa z	gagggaaagac	tt ggtggtag	ccccctg cagg	catcacactg	600
aaggaggcaa	atgaaatttt	gcagcgcagc	aa gaagggsaa	agttgc ccat	tgtaaatgaa	660
gatgatgagc	tttgtggccat	cattggccgg	ac agacactga	agaagaatcg	ggactaccc a	720
ctagccctca	aaagatgcca a	gaaacagctg	ct gtgtgggg	cagccat tgg	cactcatgag	780
gatgacaagt	ataggctgg a	cttgctcgcc	ca ggctggtg	tggatg tagt	ggttttggac	840
.tcttccccagg	gaaattccat	cttccagatc	aa tatgatca	agtaca tcaa	agacaaatac	900
cctaattctcc	aaatcttgg	aggcaatgtg	gt cactgctg	cccagg ccaa	gaacctcatt	960
gatgcaggtg	tggatgcct	gccccgtggc	at gggaaatg	gctccatctg	cattacgcag	1020
gaagtgcctg	cctgtggcgc	gcccccaagca	ac agcagtgt	acaagg tgc	agagtatgca	1080
cggcgctttg	gtgttccgg t	cattgtgtat	gg aggaatcc	aaaatgtggg	tcatattgcg	1140
aaagccctgg	cccttgggc	ctccacagtc	at gatgggt	ctctcc tggc	tgccaccact	1200
gaggccccctg	gtgaataact t	cttttccgtat	gg gatccggc	taaaga aata	tcgcggatgt	1260
ggttctctcg	atgccatgg a	caagcaccc	ag cagccaga	acagat attt	cagtgaagct	1320
gacaaaatca	aagtggccca	gggagtgtct	ggtgtgtgc	aggaca aagg	gtcaatccac	1380
aaatttgc	cttacctgtat	tgctggcatc	ca acactcat	gccagg acat	tggtgccaaag	1440
agcttgcacc	aagtcccgag c	catgatgtac	tctggggagc	ttaagt ttga	gaagagaacg	1500
tcttcagccc	agggtggaaagg	tggcgccat	agcccccatt	cgtat gagaa	gccccctttt c	1560
tga						1563

ES 2 322 477 T3

**FIGURA 7A**

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

ES 2 322 477 T3

FIGURA 7B

Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile  
325 330 335

Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala  
340 345 350

Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile  
355 360 365

Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala  
370 375 380

Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr  
385 390 395 400

Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys  
405 410 415

Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser  
420 425 430

Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly  
435 440 445

Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro  
450 455 460

Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys  
465 470 475 480

Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe  
485 490 495

Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu  
500 505 510

His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe  
515 520

# ES 2 322 477 T3

**FIGURA 8**

atgcatcacc atcaccatca cgccgactac ctgattagtg ggggcacgtc ctacgtgcc	60
gacgacggac tcacagcaca gcagctttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac	120
tttctcattc tccctgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgt	180
ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctgggttctt ctccccatgga cacagtacaca	240
gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acaggcggtt ttggcttcat ccaccacaaac	300
tgtacacctg aattccaggc caatgaagtt cggaaagtga agaaatatga acagggattc	360
atcacagacc ctgtggtctt cagccccaaag gatcgctgc gggatgttt tgaggccaag	420
gccccgcattt gtttctgcgg tatcccaatc acagacacag gegaaatggg aagcgagtt	480
gtgggcattca tctccctccag ggacattgtat ttctcaaaag aggaggaaca tgactgtttc	540
ttggaaagaga taatgacaaa gagggaaagac ttgggtggtag cccctgcagg catcacactg	600
aaggaggcaatgaaattctt gcagcgcagc aagaaggaaatggg agttgcccatt tgtaatgaa	660
gatgatgagc ttgtggccat cattggccgg acagaccctga agaagaatcg ggactaccca	720
ctagccctca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag	780
gatgacaagt ataggctggc cttgctcgcc caggctgggtt tggatgttagt ggttttggac	840
tcttccagg gaaattccat cttccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac	900
cctaattctcc aagtcatgg aggcaatgtg gtcaactgctg cccaggccaa gaacctcatt	960
gatgcagggtt tggatggccat ggggggtgggc atggggatgtt gctccatctg cattacgcag	1020
gaagtgcgtgg cctgtggggc gccccaaagca acagcagtgtt acaagggtgtc agagtatgca	1080
cggcgctttt gtttccggat cattgcgtat ggaggaatccc aaaatgtggg tcatattgcg	1140
aaaggcttgg cccttgggc ctccacagtc atgatgggtt ctctccctggc tgccaccact	1200
gaggccccgtt gtgaatactt cttttccgtat gggatccggc taaagaataatgcgat	1260
ggtttctctcg atgcccattggc caagcacctc agcagccaga acagatattt cagtgaaatgt	1320
gacaaaatca aagtggccca gggatgttgc ggtgtgtgtc aggacaaagg gtcaatccac	1380
aaatttgtcc cttacccatgtat tgctggcattc caacactcat gccaggacat tggtgccaaag	1440
agcttgcacc aagtccgcgc catgtatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg	1500
tccctcagcccc aggtggaaagg tggcgccat agcctccattt cgtatgagaa gcccgttttgc	1560
tga	1563

ES 2 322 477 T3

**FIGURA 9A**

Met His His His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr	1	5	10	15
Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys	20	25	30	
Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile	35	40	45	
Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys	50	55	60	
Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr	65	70	75.	80
Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe	85	90	95	
Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys	100	105	110	
Val Lys Lys <u>Tyr Glu Gln Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser</u>	115	120	125	
<u>Pro Lys Asp Arg Val Arg Asp Val Phe Glu Ala Lys Ala Arg His Gly</u>	130	135	140	
Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Glu Met Gly Ser Glu Leu	145	150	155	160
<u>Val Gly Ile Ile Ser Ser Arg Asp Ile Asp Phe Leu Lys Glu Glu Glu</u>	165	170	175	
<u>His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val</u>	180	185	190	
<u>Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln</u>	195	200	205	
<u>Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu</u>	210	215	220	
<u>Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro</u>	225	230	235	240
<u>Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile</u>	245	250	255	
Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala	260	265	270	
Gly Val Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe	275	280	285	
Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln	290	295	300	

# ES 2 322 477 T3

## FIGURA 9B

Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile  
305                   310                   315                   320

Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile  
325                   330                   335

Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala  
340                   345                   350

Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile  
355                   360                   365

Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala  
370                   375                   380

Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr  
385                   390                   395                   400

Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys  
405                   410                   415

Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser  
420                   425                   430

Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly  
435                   440                   445

Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro  
450                   455                   460

Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys  
465                   470                   475                   480

Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe  
485                   490                   495

Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu  
500                   505                   510

His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe  
515                   520

# ES 2 322 477 T3

**FIGURA 10**

atgcacatcacc atcaccatca cgccgactac ctgattagtg gggcacgtc ctacgtgcca	60
gacgacggac tcacagcaca gcagctttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac	120
tttcttcattc tccctggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgt	180
ctgaccaaga aaatcactt taagacccc ctgtttctt cttccatgga cacagtcaca	240
gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acaggcgta ttggcttcat ccaccacaac	300
tgtacacctg aattccaggc caatgaagtt cggaaagtga agaaatatga acagggattc	360
atcacagacc ctgtggctt cagccccaaag gatcgctgc gggatgttt tgaggccaag	420
gccccggcatg gtttctgcgg tatcccaatc acagacacag gccggatggg gagccgcttg	480
gtgggcatca tcttcctccga agacattgtat ttctcgagg aggaggaaca tgactgtttc	540
ttggaagaga taatgacaaa gagggaaagac ttgggtggtag cccctgcagg catcacactg	600
aaggaggcaa atgaaattctt gcagecgacg aagaaggaa agttgcccatt tgaaatgaa	660
gatgatgagc ttgtggccat cattggccgg acagacctga agaagaatcg ggactaccca	720
ctagcctcca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag	780
gatgacaagt ataggctgga cttgctcgcc caggtggtg tggatgtagt ggttttggac	840
tcttccagg gaaattccat cttccagatc aatatgtca agtacatcaa agacaaatac	900
cctaattctcc aagtcatgtt aggcaatgtg gtcaactgtc cccaggccaa gaaccttatt	960
gatgcagggt tggatgcctt ggggtgggc atggaaagtgc gctccatcgt cattacgcag	1020
gaagtgcgtgg cctgtggcgcc gccccaaagca acagcgtgt acaagggtgtc agagtatgca	1080
cgggcgccccgt gtgtttccgtt cattgcgtat ggaggaatcc aaaatgtggg acatattgcg	1140
aaaggccctgg cccttggggc ctccacacac atgatggctt ctcttcgtgc tgccaccact	1200
gaggccccctg gtgaataactt cttttccgtt gggatccggc taaagaaata tcgcggatgt	1260
ggtttctctcg atgccatgga caagcacctc agcagccaga acagatattt cagtgaagct	1320
gacaaaatca aagtggccca gggaggtgtct ggtgcgtgtc aggacaaagg gtcaatccac	1380
aaatttgtcc cttacctgtat tgctggcatc caacactcat gccaggacat tggtgccaaag	1440
agcttgaccc aagtccgagc catgatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg	1500
tcttcagccc aggtggaaagg tggcgccat agcctccatt cgtatgagaa gggcttttc	1560
tga	1563

# ES 2 322 477 T3

## FIGURA 11A

Met His His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr  
 1 5 10 15

Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys  
 20 25 30

Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile  
 35 40 45

Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys  
 50 55 60

Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr  
 65 70 75 80

Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe  
 85 90 95

Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys  
 100 105 110

Val Lys Lys Tyr Glu Gln Gly phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser  
 115 120 125

Pro Lys Asp Arg Val Arg Asp Val Phe Glu Ala Lys Ala Arg His Gly  
 130 135 140

Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Arg Met Gly Ser Arg Leu  
 145 150 155 160

Val Gly Ile Ile Ser Ser Glu Asp Ile Asp Phe Leu Glu Glu Glu  
 165 170 175

His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val  
 180 185 190

Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln  
 195 200 205

Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu  
 210 215 220

Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro  
 225 230 235 240

Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile  
 245 250 255

Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala  
 260 265 270

Gly Val Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe  
 275 280 285

Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln  
 290 295 300

**FIGURA 11B**

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

# ES 2 322 477 T3

**FIGURA 12**

atgcatcacc atcaccatca cggcgactac ct gattatgt ggggca cgtc ctacgtgcca	60
gacgacggac tcacagcac a gcagcttcc a actgcggag acggcctcac ctacaatgac	120
ttttcattc tccctgggt a catcgacttc ac tgcagacc aggtggacct gacttctgt	180
ctgacccaaga aaatcactct taagacccca ct ggtttctt cteccatgga cacagtaca	240
gaggctggga tggccatagc aatggcgctt ac aggccgta ttggcttcat ccaccacaac	300
tgtacacctg aatcccaggc caatgaagtt cg gaaagtga agaaat atga acagggatcc	360
atcacagacc ctgtggtcc t cagccccaaag ga tcgcgtgc gggatgttt tgaggcoga	420
gccgagcatg gtttctgcgg tatcccaatc ac agacacag gccggatggg gagccgttg	480
gtgggcataa tttcccccag ggacattgtat tt tctcaaag aggaggaaaca tgactgttc	540
ttggaaagaga taatgacaa a gagggaaagac tt ggtggtag cccctgcagg catcacactg	600
aaggaggcaa atgaaatctt gcagcgcgc aa gaagggaa agttgcctat tgtaatgaa	660
gatgatgagc ttgtggccat cattgccccgg ac agacctga agaaga atcg ggactaccc a	720
ctagctcca aagatgcca a gaaacagctg ct gtgtgggg cagccattgg cactcatgag	780
gtgacaatgt ataggctgg a ttgtctcgcc a ggctggtg tggatgttgtt ggtttggac	840
tttcccccagg gaaattccat ttccagatc aa tatgatca agtacatcaa agacaaatac	900
cctaattcc aagtccattgg aggcaatgtg gt cactgtg cccaggccaa gaaccttatt	960
gatgeaggtg tggatgcctt ggggtgggc at gggaaatg gtcctatctg cattacgcag	1020
gaagtgcgttgg cctgtggcgc gccccaaagca ac agcagtgt acaagggtgtc agagtatgca	1080
cggcgccctt ggttccggat cattgtgtat gg aggaatcc aaaatgtggg tcatattgcg	1140
aaaggccctgg cccttggggc ctccacagtc at gatgggtt ctctccatggc tgccaccact	1200
gaggccccgt gtaataactt ttccctgtat ggatccggc taaaagaata tcgcggatgt	1260
ggtttctctcg atgcccatttca caagcacctc ag cagccaga acagatattt cagtgaagct	1320
gacaaaaatca aagtggccc a gggaggtgtt gg tgcgtgtgc aggaca aagg gtcaatccac	1380
aaatttgcctt tttacactgtat tgcgtggcatac ca acactcat gcccaggacat tggtgccaa	1440
agcttgcacc aagtccgagc catgtatgtac tc tggggagc ttaagtttga gaagagaacg	1500
tcctcagccc aggtggaaagg tggcgccat ag cctccatt cgtatgagaa gcccgttttc	1560
tga	1563

ES 2 322 477 T3

**FIGURA 13A**

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

ES 2 322 477 T3

**FIGURA 13B**

Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile  
305                   310                   315                   320

Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile  
325                   330                   335

Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala  
340                   345                   350

Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile  
355                   360                   365

Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala  
370                   375                   380

Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr  
385                   390                   395                   400

Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys  
405                   410                   415

Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser  
420                   425                   430

Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly  
435                   440                   445

Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro  
450                   455                   460

Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys  
465                   470                   475                   480

Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe  
485                   490                   495

Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu  
500                   505                   510

His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe  
515                   520

# ES 2 322 477 T3

**FIGURA 14**

atgcatcacc atcaccatca cgccgactac ctgattagt gggcacgtc ctacgtgcc	60
gacgacggac tcacagcaca gcagctttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac	120
tttctcattc tcccggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgct	180
ctgaccaaga aaatcactt taagaccca ctggtttct ctcacatgga cacagtcaca	240
gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acaggcggtt ttggcttcat ccaccacaac	300
tgtacacctg aatccaggc caatgaagtt cggaaagtga agaaaatataa acagggatcc	360
atcacagacc ctgtggtctt cagccccaaag gatcgctgc gggatgttt tgaggccaag	420
gccccggatg ttgtctgcgg tatcccaatc acagacacag gccggatggg gagccgcttg	480
gtgggcatca tcteetccga agacattgtt tttctcgagg aggaggaaca tgactgtttc	540
ttggaaagaga taatgacaaa gagggaaagac ttgtggtag cccctgcagg catcacactg	600
aaggaggcaa atgaaatct gcagcgcagc aagaaggaa agttgcccatt tgtaatgaa	660
gatgatgagc ttgtggccat cattggccgg acagacctga agaagaatcg ggactaccca	720
ctagcctcca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccatgg cactcatgag	780
gatgacaagt ataggctgga cttgctcgcc caggctgggtt tggtatgtt ggtttggac	840
tcttcccagg gaaattccat cttccagatc aatatgtca agtacatcaa agacaatac	900
cctaatactcc aagtcatgtt aggcaatgtt gtcactgtt cccaggccaa gaaccttatt	960
gatgcagggtt tggatgcctt gccccggatggc atgggaagtg gctccatctg cattacgcag	1020
gaagtgttggc cctgtggcg gcccccaagca acagcagtgtt acaagggtgc agagtatgca	1080
cggegctttt gttttccgtt cattgtgtt ggaggaatcc aaaaatgtggg tcatattgcg	1140
aaagccctgg cccttgggc ctccacagtc atgtatggctt ctcttgcgtt tgccaccact	1200
gaggccccctg gtgaatactt cttttccgtt gggatccggc taaaagaaata tcgcgttatg	1260
ggtttctctcg atgcccatttca aagcacccctc agcagccaga acagatattt cagtgaagct	1320
gacaaaatca aagtggccca gggaggtgtt ggtgtgtgc aggacaaaagg gtcaatccac	1380
aaatttgcctt cttacactgtt tgctggcattt caacacttgcat gccaggacat tgggtgcac	1440
agcttgaccc aagtccgagc catgtatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg	1500
tcctcagccc aggtggaaagg tggcgccat agccctccatt cgtatgagaa ggggttttc	1560
tga	1563

# ES 2 322 477 T3

## FIGURA 15A

Met His His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr  
 1 5 10 15

Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys  
 20 25 30

Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile  
 35 40 45

Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys  
 50 55 60

Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr  
 65 70 75 80

Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe  
 85 90 95

Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys  
 100 105 110

Val Lys Lys Tyr Glu Gln Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser  
 115 120 125

Pro Lys Asp Arg Val Arg Asp Val Phe Glu Ala Lys Ala Arg His Gly  
 130 135 140

Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Arg Met Gly Ser Arg Leu  
 145 150 155 160

Val Gly Ile Ile Ser Ser Glu Asp Ile Asp Phe Leu Glu Glu Glu  
 165 170 175

His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val  
 180 185 190

Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln  
 195 200 205

Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu  
 210 215 220

Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro  
 225 230 235 240

Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile  
 245 250 255

Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala  
 260 265 270

Gly Val Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe  
 275 280 285

Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln  
 290 295 300

ES 2 322 477 T3

**FIGURA 15B**

Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile  
305                   310                   315                   320

Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile  
325                   330                   335

Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala  
340                   345                   350

Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile  
355                   360                   365

Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala  
370                   375                   380

Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr  
385                   390                   395                   400

Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys  
405                   410                   415

Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser  
420                   425                   430

Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly  
435                   440                   445

Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro  
450                   455                   460

Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys  
465                   470                   475                   480

Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe  
485                   490                   495

Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu  
500                   505                   510

His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe  
515                   520

ES 2 322 477 T3

## **FIGURA 16**

atgcatcacc atcaccatca cgccgactac ctgatttagtggggcacgtc ctacgtgcac 60  
gacgacggac tcacagcaca gcagcttttc aactgcggag acggccac acataatgac 120  
tttctcatc tccctggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgtc 180  
ctgaccaaga aaatcacttc taagacccca ctggtttctt ctcctatgga cacagtcaca 240  
gaggctggaa tggccatagc aatggcgctt acaggcggta ttggcttcat ccaccacaac 300  
tgtacacctg aatcccgaggc caatgaagtt cgaaaagtga agaaaatatga acagggattc 360  
atcacagacc ctgtggtctt cagccccgaa gatgaggtgg aagatgtttt tgaggccgaa 420  
gccgagcatg gtttctgccc tatcccaatc acagacacag gcgaaatggg aagcgagttg 480  
gtggggcatca tctccctccag ggacattgtat ttctcaaaag aggaggaaca tgactgtttc 540  
ttggaaagaga taatgacaaa gagggaaagac ttggtggttag cccctgcagg catcacactg 600  
aaggaggcaa atgaaattctt gcagcgcgc aagaagggaa agttgcccatt tgtaaatgaa 660  
gatgatgagc ttgtggccat cattggcccg acagacctga agaagaatcg ggactaccca 720  
ctagcctcca aagatgcca aaaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag 780  
gatgacaagt ataggctgga cttgctcgcc caggctggtg tggatgttagt ggttttggac 840  
tcttcccagg gaaattccat cttccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac 900  
cctaattctcc aagtcatgg aggcaatgtg gtcaactgtg cccaggccaa gaacctcatt 960  
gatgcaggtg tggatgcctt gcgggtgggc atggaaagtgc gtcctatctg cattacgcag 1020  
gaagtgtctgg cctgtggggc gccccaaagca acagcagtgt acaagggtgtc agagtatgca 1080  
cggcgccttgc ttgttccggc cattgctgtat ggaggaatcc aaaatgtggg tcataattgg 1140  
aaaggcccttgg cccttggggc ctccacagtc atgatgggctt ctctccctggc tgccaccact 1200  
gaggccccctg gtgaataactt cttttccgtt gggatccggc taagaaaata tcgcggatgt 1260  
ggtttctctcg atgcctatgga caagcacctc acaagccaga acagatattt cagtgaagct 1320  
gacaaaaatca aagtggccca gggagttgtctt ggtgtgtgc aggacaaagg gtcataatccac 1380  
aaatttgcctt cttacactgtat tgctggcattt caacactcat gccaggacat tggtggccaaag 1440  
agcttgcacc aagtcccgagc catgtatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg 1500  
tcctcageccc aggtggaaagg tggcgtccat agccctccattt cgtatgagaa ggggttttc 1560  
tga 1563

## **FIGURA 17A**

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

# ES 2 322 477 T3

## FIGURA 17B

Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile  
305 310 315 320

Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile  
325 330 335

Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala  
340 345 350

Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile  
355 360 365

Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala  
370 375 380

Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr  
385 390 395 400

Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys  
405 410 415

Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser  
420 425 430

Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly  
435 440 445

Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro  
450 455 460

Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys  
465 470 475 480

Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe  
485 490 495

Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu  
500 505 510

His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe  
515 520

FIGURA 18

Tasa de estabilidad de R1 ampliada (wt)

R2 = NP40

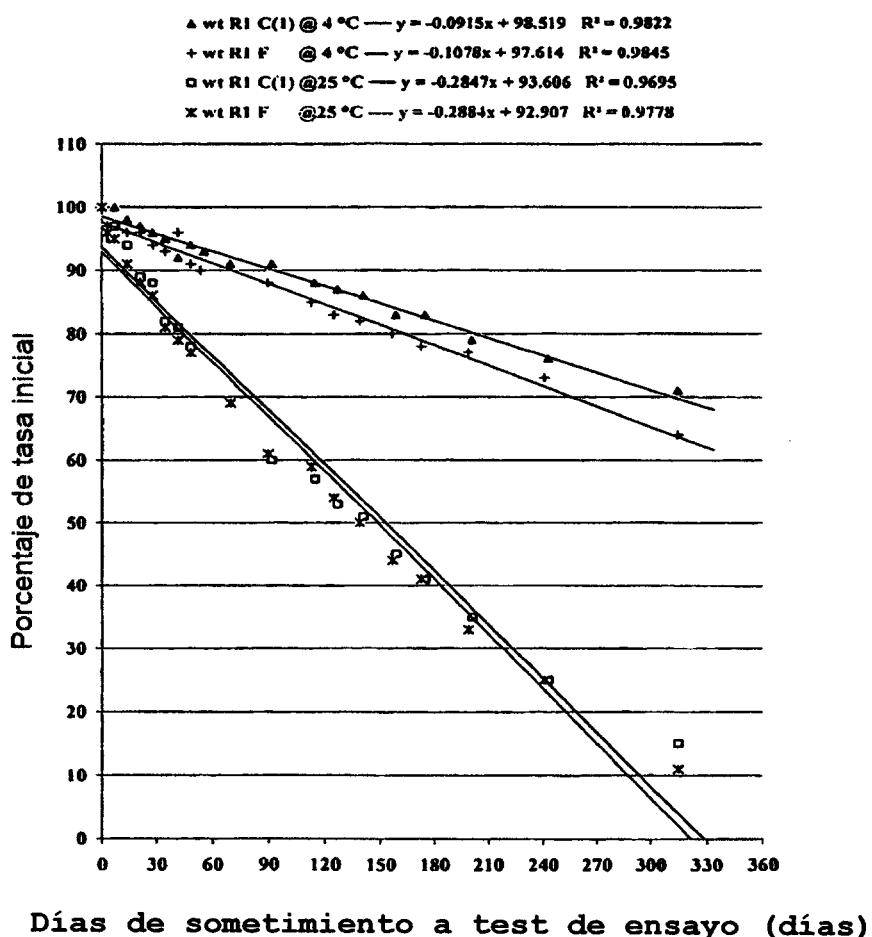


FIGURA 19

Tasa de estabilidad de R1 ampliada (wt + AH)

R2 = NP40

$$\Delta \text{ wt+AH R1 C(I) @ } 4^\circ\text{C} \quad y = -0.0923x + 100.74 \quad R^2 = 0.9858$$

$$+ \text{ wt+AH R1 F @ } 4^\circ\text{C} \quad y = -0.1314x + 100.13 \quad R^2 = 0.987$$

$$\square \text{ wt+AH R1 C(I) @ } 25^\circ\text{C} \quad y = -0.2930x + 94.937 \quad R^2 = 0.9531$$

$$\times \text{ wt+AH R1 F @ } 25^\circ\text{C} \quad y = -0.3136x + 92.970 \quad R^2 = 0.9544$$

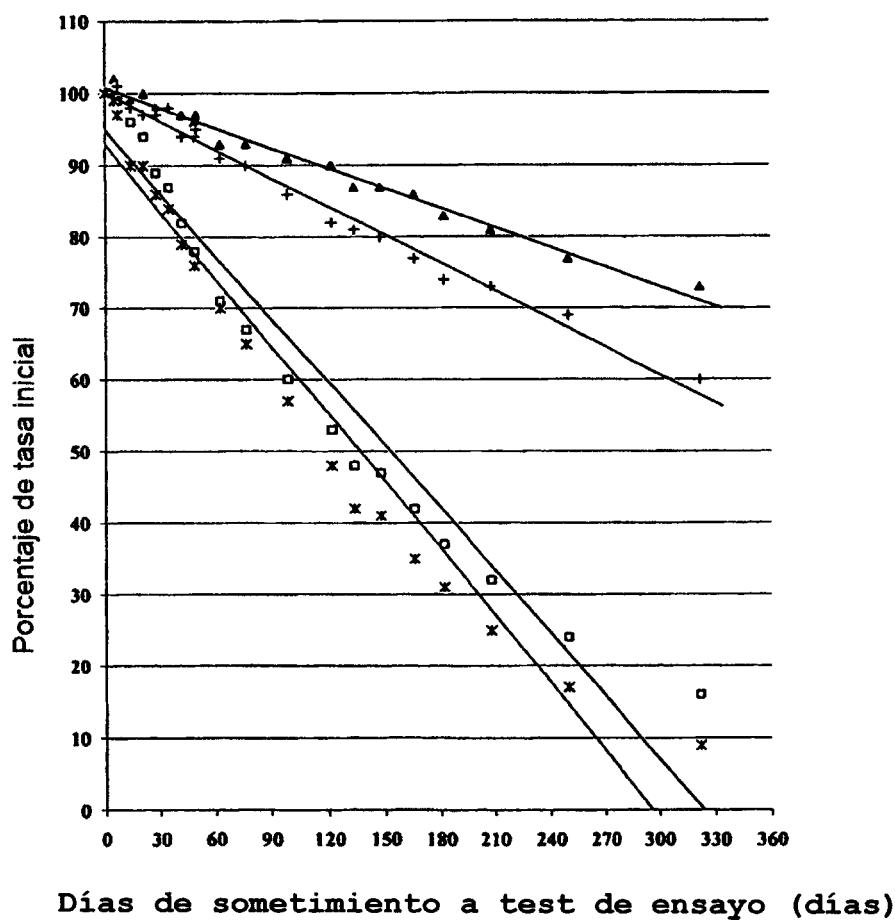
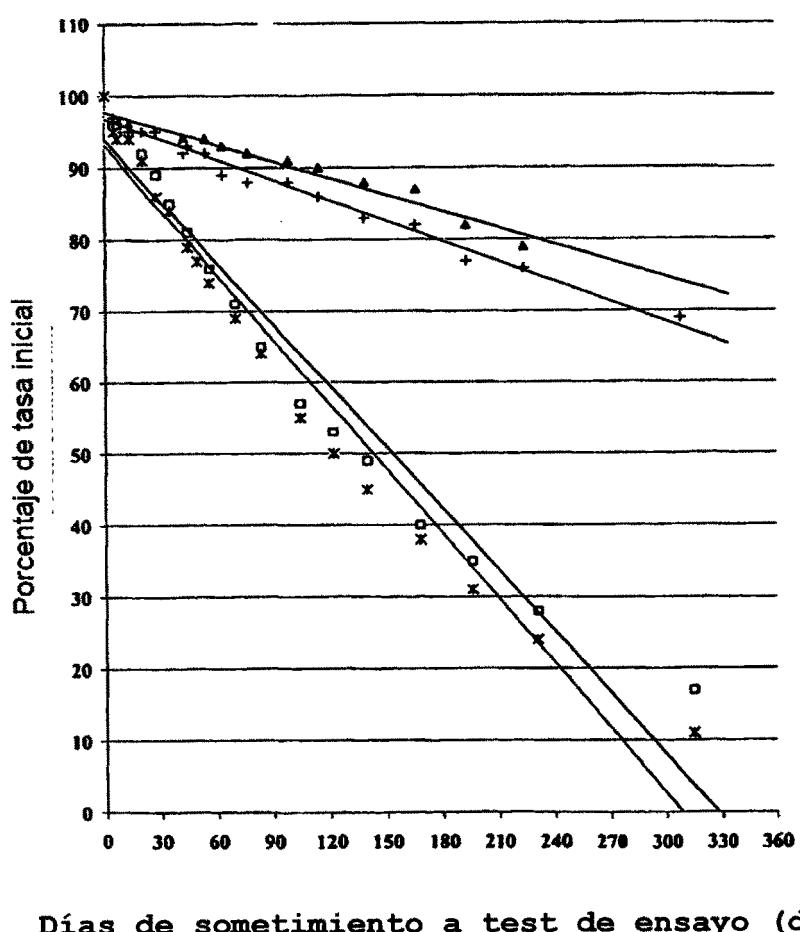


FIGURA 20

Tasa de estabilidad de R1 ampliada

(Δ2B + AH clon A) R2 = NP40

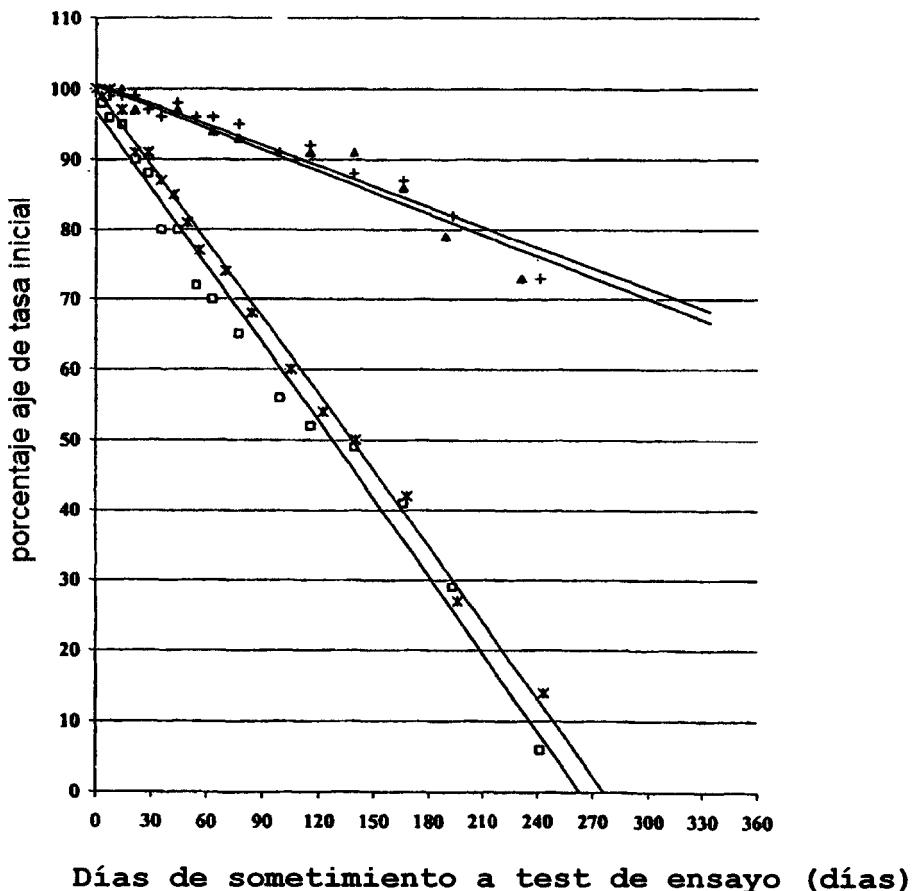
▲ D2B+AH Clon A R1 C(I) @ 4 °C —  $y = -0.0766x + 97.756$   $R^2 = 0.9584$ + D2B+AH Clon A R1 F @ 4 °C —  $y = -0.0944x + 96.827$   $R^2 = 0.9782$ □ D2B+AH Clon A R1 C(I) @ 25 °C —  $y = -0.2864x + 93.951$   $R^2 = 0.9591$ x D2B+AH Clon A R1 F @ 25 °C —  $y = -0.3018x + 93.211$   $R^2 = 0.9645$ 

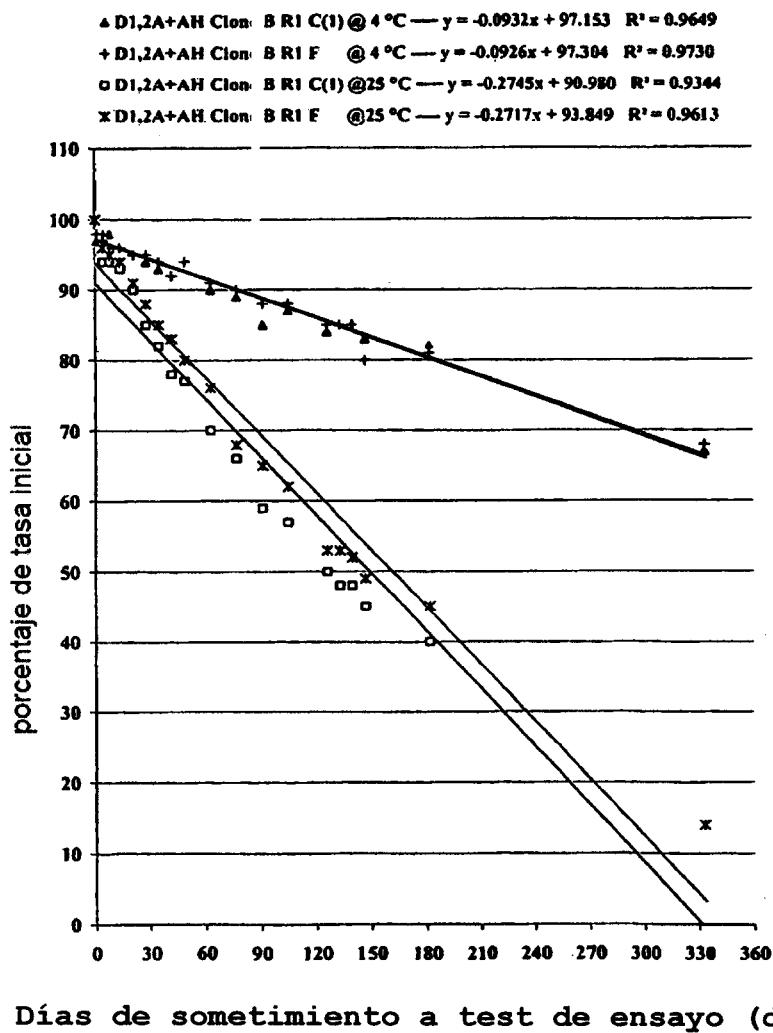
**FIGURA 21**

Tasa de estabilidad de R1 ampliada

((Δ 3 + 1) + AH clon A) R2 = NP40

$\Delta$  (D3+1A)+AH Clon A R1 C(I) @ 4 °C —  $y = -0.1015x + 100.50$   $R^2 = 0.9260$   
 $+$  (D3+1A)+AH Clon A R1 F @ 4 °C —  $y = -0.0973x + 100.731$   $R^2 = 0.9414$   
 $\square$  (D3+1A)+AH Clon A R1 C(I) @ 25 °C —  $y = -0.3682x + 96.779$   $R^2 = 0.9846$   
 $\times$  (D3+1A)+AH Clon A R1 F @ 25 °C —  $y = -0.3615x + 99.830$   $R^2 = 0.9957$



**FIGURA 22****Tasa de estabilidad de R1 ampliada****(Δ 1,2A + AH clon B) R2 = NP40**

**FIGURA 23**

Tasa de estabilidad de R1 ampliada

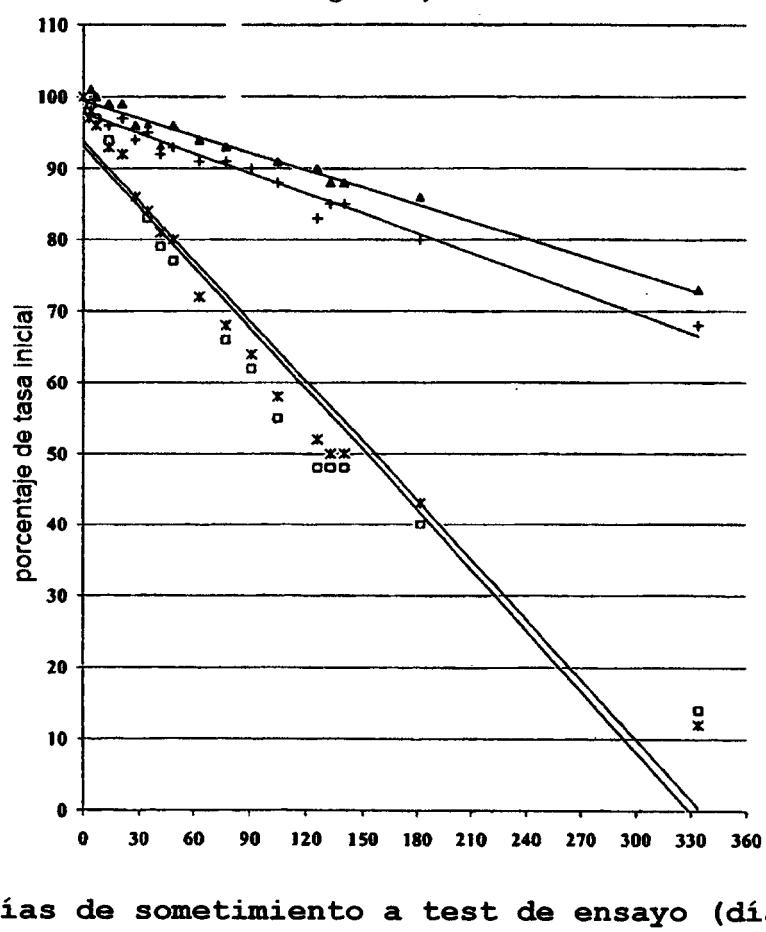
(Δ 3B + AH clon B) R2 = NP40

▲ D3B+AH Clon B R1 C(I) @ 4 °C —  $y = -0.0803x + 99.411$   $R^2 = 0.9682$

+ D3B+AH Clon B R1 F @ 4 °C —  $y = -0.0935x + 97.736$   $R^2 = 0.9748$

□ D3B+AH Clon B R1 C(I) @25 °C —  $y = -0.2834x + 93.158$   $R^2 = 0.9270$

✗ D3B+AH Clon B R1 F @25 °C —  $y = -0.2798x + 93.832$   $R^2 = 0.9536$



**FIGURA 24**

**Tasa de estabilidad de R1 ampliada**

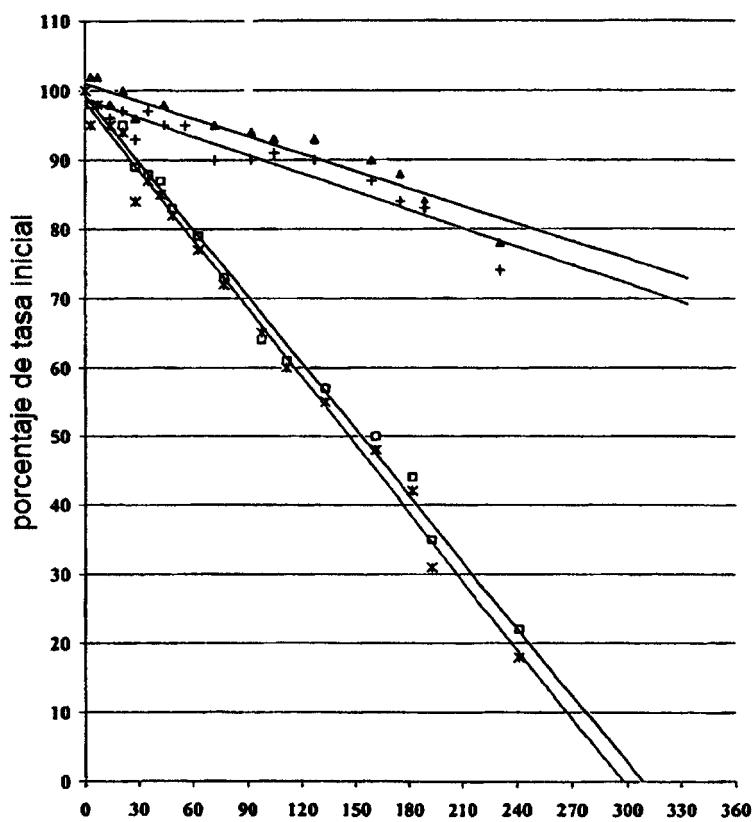
**(Δ 1, 2A + AH clon B) R2 = NP40**

▲ (D2+1A)+AH Clon B R1 C(I) @ 4 °C —  $y = -0.0843x + 101.03$   $R^2 = 0.9233$

+ (D2+1A)+AH Clon B R1 F @ 4 °C —  $y = -0.0886x + 98.724$   $R^2 = 0.9199$

□ (D2+1A)+AH Clon B R1 C(I) @25 °C —  $y = -0.3218x + 99.304$   $R^2 = 0.9943$

× (D2+1A)+AH Clon B R1 F @25 °C —  $y = -0.3305x + 98.347$   $R^2 = 0.9915$



**Días de sometimiento a test de ensayo (días)**

# ES 2 322 477 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Dorn, Allan R.  
Rugaber, Janice E.  
5  
<120> DESHIDROGENASAS DE MONOFOSFATO DE INOSINA MODIFICADAS  
  
<130> 35913-73956  
10  
<160> 22  
  
<170> Patent In version 3.2  
15  
<210> 1  
<211> 43  
<212> DNA  
20 <213> *Homo sapiens*  
  
<400> 1  
  
25 ggagatatac atatgcata ccatcaccat cacggcgact acc 43  
  
<210> 2  
<211> 43  
30 <212> DNA  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 2  
35 ggttagtcggc gtgatggta tggtgatgca tatgtatatac tcc 43  
  
<210> 3  
40 <211> 64  
<212> DNA  
<213> *Homo sapiens*  
  
45 <400> 3  
  
50 **ggtcctcagc cccgaagatg aggttgaaga tgttttgag gccgaagccg agcatggttt** 60  
**ctgc** 64  
  
55 <210> 4  
55 <211> 64  
<212> DNA  
<213> *Homo sapiens*  
  
60 <400> 4  
  
65 **gcagaaacca tgctcggtt cggcctcaaa aacatcttcc acctcatctt cggggctgag** 60  
**gacc** 64

# ES 2 322 477 T3

<210> 5		
<211> 39		
<212> DNA		
5 <213> <i>Homo sapiens</i>		
<400> 5		
10 ccaatcacag acacaggcga aatggggagc gagttggtg		39
<210> 6		
<211> 39		
15 <212> DNA		
<213> <i>Homo sapiens</i>		
<400> 6		
20 caccaactcg ctccccattt cgccctgtgc tgtgatttg		39
<210> 7		
25 <211> 46		
<212> DNA		
<213> <i>Homo sapiens</i>		
30 <400> 7		
ggcatcatct cctccgaaga cattgatttt ctcgaggagg aggaac		46
35 <210> 8		
<211> 46		
<212> DNA		
40 <213> <i>Homo sapiens</i>		
<400> 8		
45 gttcctcctc ctcgagaaaa tcaatgtctt cgaggaggat gatgcc		46
<210> 9		
<211> 1545		
50 <212> DNA		
<213> <i>Homo sapiens</i>		
<220>		
55 <221> inicio de transcripción (características misceláneas)		
<222> (350)..(555)		
<223> subdominio		
60 <400> 9		
atggccgact acctgattag tgggggcacg tcctacgtgc cagacgacgg actcacagca	60	
cagcagctct tcaactgcgg agacggcctc acctacaatg actttctcat tctccctggg	120	
65 tacatcgact tcactgcaga ccaggtggac ctgacttctg ctctgaccaa gaaaatcact	180	
cttaagaccc cactggtttc ctctccatg gacacagtca cagaggctgg gatggccata	240	

ES 2 322 477 T3

5	gcaatggcgc ttacaggcgg tattggcttc atccaccaca actgtacacc tgaattccag gccaatgaag ttcgaaagt gaagaaatat gaacagggat tcatacaga ccctgtggtc ctcagccccca aggatcgctg gcgggatgtt tttgaggcca aggcccggca tggtttctgc ggtatcccaa tcacagacac agggccggatg gggagccgct tggtgccat catctccctcc agggacattg attttctcaa agaggaggaa catgactgtt tcttggaaaga gataatgaca aagagggaaag acttggtggt agcccttgca ggcatacacac tgaaggaggc aaatgaaatt ctgcagcgca gcaagaaggg aaagttggcc attgtaaatg aagatgtga gcttggcc atcattgccc ggacagaccc taagaagaat cgggactacc cactagcctc caaagatgcc aagaaacagc tgctgtgtgg ggcagccattt ggcactcatg agatgacaa gtataggctg gacttgcctg cccaggctgg tgtggatgta gtgggtttgg actttccca gggaaattcc atcttccaga tcaatatgtat caagtacatc aaagacaaaat accctaattt ccaagtcatt ggaggcaatg tggtaactgc tgcccaggcc aagaacctca ttgatgcagg tgtggatgcc ctgcgggtgg gcatggaaag tggctccatc tgcattacgc aggaagtgc ggcctgtgg cgcccccag caacagcagt gtacaagggtg ttagatgtatc cacggcgctt tggtgttccg gtcattgcctg atggaggaat caaaaatgtg ggtcatattt cgaaagcctt ggccttgg gcctccacag tcatgtggg ctctctcctg gctgccacca ctgaggcccc tggtaatac ttctttccg atggatccg gctaaagaaa tatcgccgtt tgggttctct cgtgcctatg gacaagcacc tcaagcagccaa gaacagatat ttcaatgtt gtagatgtt ctttttttt cagggagtgt ctgggtgtgt gcaggacaaa gggtaatcc acaaatttgt cccttacctg attgtggca tccaaacactc atgccaggac attggtgccaa agatgttgcac ccaagtcctg gccatgtgtt actctggggaa gcttaatgtt gagaagagaa cgtccctcagc ccaggtggaa ggtggcggtcc atagcctcca ttcaatgtt gtagatgtt ctttttttt 40 ggtggcggtcc atagcctcca ttcaatgtt gtagatgtt ctttttttt 1545	300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320 1380 1440 1500 1545
---	---	--

45 <210> 10  
<211> 514  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

50 <220>  
<221> DOMINIO  
<222> (111)..(243)

55 <223> subdominio

60

65

ES 2 322 477 T3

<400> 10

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

# ES 2 322 477 T3

195                    200                    205

5                    Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu Val Ala Ile Ile Ala Arg  
                   210                                215                                220

10                    Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro Leu Ala Ser Lys Asp Ala  
                   225                                230                                235                                240

15                    Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile Gly Thr His Glu Asp Asp  
                   245                                250                                255

20                    Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala Gly Val Asp Val Val Val  
                   260                                265                                270

25                    Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe Gln Ile Asn Met Ile Lys  
                   275                                280                                285

30                    Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln Val Ile Gly Gly Asn Val  
                   290                                295                                300

35                    Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile Asp Ala Gly Val Asp Ala  
                   305                                310                                315                                320

40                    Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile Cys Ile Thr Gln Glu Val  
                   325                                330                                335

45                    Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala Val Tyr Lys Val Ser Glu  
                   340                                345                                350

50                    Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile Ala Asp Gly Gly Ile Gln  
                   355                                360                                365

55                    Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Ser Thr Val  
                   370                                375                                380

60                    Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr Glu Ala Pro Gly Glu Tyr  
                   385                                390                                395                                400

65                    Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys Tyr Arg Gly Met Gly Ser  
                   405                                410                                415

55

60

65

ES 2 322 477 T3

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

5 Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly Val Ser Gly Ala Val Gln  
435 440 445

10 Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro Tyr Leu Ile Ala Gly Ile  
450 455 460

15 Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys Ser Leu Thr Gln Val Arg  
465 470 475 480

20 Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe Glu Lys Arg Thr Ser Ser  
485 490 495

25 Leu Phe

30 <210> 11  
<211> 1563  
<212> DNA  
<213> *Homo sapiens*

35 <220>  
<221> mutación  
<222> (4)..(21)  
40 <223> inserción

<220>  
<221> INICIO DE TRANSCRIÓN (CARACTERÍSTICAS MISCELANEAS)  
45 <222> (350)..(555)  
<223> subdominio

50 <400> 11

55 atgcatcacc atcaccatca cgccgactac ctgatttagtg ggggcacgtc ctacgtgcca 60  
gacgacggac tcacagcaca gcagctttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac 120  
tttctcattc tccctggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgt 180  
ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctggtttccct ctccccatgga cacagtacaca 240

60

# ES 2 322 477 T3

	gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acaggcgta ttggcttcat ccaccacaac	300
5	tgtacacctg aattccaggc caatgaagtt cggaaagtga agaaaatatga acagggattc	360
	atcacagacc ctgtggtcct cagccccaaag gatcgcgtgc gggatgttt tgaggccaag	420
	gcccgcatg gtttctgcgg tatcccaatc acagacacag gccggatggg gagccgctt	480
10	gtgggcatca ttcctccag ggacattgtat ttctcaaag aggaggaaca tgactgtttc	540
	ttggaagaga taatgacaaa gagggaaagac ttgggttag cccctgcagg catcacactg	600
	aaggaggcaa atgaaattct gcagcgcagc aagaaggaa agttgcccatt tgtaatgaa	660
15	gatgatgagc ttgtggccat cattgccccg acagacctga agaagaatcg ggactaccca	720
	ctagcctcca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag	780
	gatgacaagt ataggctgga cttgctcgcc caggctggtg tggatgtagt ggaaaaatggac	840
20	tttcccccagg gaaattccat ttccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac	900
	cctaattctcc aagtcaattgg aggcaatgtg gtcaactgtg cccaggccaa gaaccttatt	960
	gatgcagggtg tggatggccct gcgggtgggc atggaaagtgc gtcacatctg cattacqca	1020
25	gaagtgttgg cctgtgggcg gccccaaagca acagcagtgt acaaggtgtc agagtatgca	1080
	cggcgctttg gtgttccggat cattgtgtat ggaggaatcc aaaatgtggg tcataattgcg	1140
	aaaggcattgg cccttggggc ctccacagtc atgtgggtcttcttcgttgc tgccaccact	1200
30	gaggccccctg gtgaataactt cttttccgat gggatccggc taaagaaata tcgcggatgt	1260
	ggtttctctcg atgccatggca caagcacctc agcagccaga acagatattt cagtgaagct	1320
	gacaaaatca aagtggccca gggagtgtct ggtgtgtgc aggacaaaagg gtcaatccac	1380
35	aaatttgtcc cttacctgtat tgctggcatac caacactcat gccaggacat tggtgccaa	1440
	agcttgcacc aagtccgagc catgtgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg	1500
	tcctcagccc aggtggaaagg tggcgatccat agcctccatt cgtatgagaa gcccgtttt	1560
40	tga	1563

45 <210> 12  
 <211> 520  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 50 <220>  
 <221> inicio de transcripción (características misceláneas)  
 <222> (2)..(7)  
 55 <223> his tag

60

65

ES 2 322 477 T3

<400> 12

5           Met His His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr  
1                 5                           10                           15

10           Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys  
20                 25   30

15           Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile  
35                 40   45

Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys  
50                 55   60

20           Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr  
65                 70                                   75                           80

25           Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe  
85                 90                                   95

30           Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys  
100                 105                                   110

Val Lys Lys Tyr Glu Gln Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser  
115                 120                                   125

35           Pro Lys Asp Arg Val Arg Asp Val Phe Glu Ala Lys Ala Arg His Gly  
130                 135                                   140

40           Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Arg Met Gly Ser Arg Leu  
145                 150                                   155                           160

45           Val Gly Ile Ile Ser Ser Arg Asp Ile Asp Phe Leu Lys Glu Glu Glu  
165                 170                                   175

His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val  
180                 185                                   190

50

55

60

65

ES 2 322 477 T3

Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln  
195 200 205

5 Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu  
210 215 220

10 Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro  
225 230 235 240

15 Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile  
245 250 255

Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala  
260 265 270

20 Gly Val Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe  
275 280 285

25 Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln  
290 295 300

30 Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile  
305 310 315 320

Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile  
325 330 335

35 Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala  
340 345 350

40 Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile  
355 360 365

45 Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala  
370 375 380

Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr  
385 390 395 400

50 Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys  
405 410 415

55

60

65

# ES 2 322 477 T3

	Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser			
	420	425	430	
5	Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly			
	435	440	445	
10	Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro			
	450	455	460	
15	Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys			
	465	470	475	480
20	Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe			
	485	490	495	
	Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu			
	500	505	510	
25	His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe			
	515	520		
30	<210> 13			
	<211> 1563			
	<212> DNA			
35	<213> <i>Homo sapiens</i>			
	<220>			
	<221> mutación			
40	<222> (4)..(21)			
	<223> inserción			
	<220>			
45	<221> inicio de transcripción (características misceláneas)			
	<222> (350)..(555)			
	<223> subdominio			
50	<400> 13			
55	atgcatcacc atcaccatca cgccgactac ctgattagt ggggcacgtc ctacgtgcc 60			
	gacgacggac tcacagcaca gcagctttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac 120			
	tttctcattc tccctggta catcgacttc actgcagacc aggtggacet gacttctgt 180			
60	ctgaccaaga aaatcactct taagaccca ctggttcct ctcctatgga cacagtcaca 240			

# ES 2 322 477 T3

	gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acaggcgta ttggcttcat ccaccacaac	300
5	tgtacacctg aattccagge caatgaagtt cggaaagtga agaaatatga acagggatTC	360
	atcacagacc ctgtggtctt cagccccaaag gatcgctgc gggatTTTT tgaggccaag	420
	gcccccatg gtttctgcgg tatcccaatc acagacacag gcgaaatggg aagcgagttg	480
10	gtggcatac tctccctecag ggacattgtat ttctcaag aggaggaca tgactgttc	540
	ttgaaagaga taatgacaaa gagggaaagac ttggtggtag cccctgcagg catcacactg	600
	aaggaggcaa atgaaattct gcagcgcagc aagaaggaa agttggccat tgtaaatgaa	660
15	gatgatgagc ttgtggccat cattgcccgg acagacctga agaagaatcg ggactaccca	720
	ctagcctcca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag	780
	gatgacaagt ataggctgga cttgtcgcc caggctggg tggatgtatg ggtttggac	840
20	tcttcccagg gaaattccat ctccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac	900
	cctaattctcc aagtcatgttgg aggcaatgtg gtcactgtg cccaggccaa gaaaccttatt	960
	gatgcagggtg tggatgcccgc gccccggatggg atggaaatgt gtcctatctg cattacgcag	1020
	gaagtgtcg cctgtggcg gccccaaagca acagcagtgt acaagggtgc agagtatgca	1080
25	cggcgctttg gtgttccggat cattgtctatggat ggaggaatcc aaaatgtggg tcattttgcg	1140
	aaagcccttgg cccttggggc ctccacatgc atgatgggtt ctctctggc tgccaccact	1200
	gaggccccctg gtgaaatactt ctttccgtat gggatccggc taaagaaata tcgcggatgt	1260
30	ggttctctcg atgcccatttgc caagcacctc agcagccaga acagatattt cagtgaaatgt	1320
	gacaaaaatca aagtggccca gggagtgtct ggtgtgtgc aggacaaaagg gtcaatccac	1380
	aaatttgccc cttacccatgtatgtatccatc caacactcat gccaggacat tggtgccaaag	1440
35	agcttgaccc aagtccgagc catgtatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg	1500
	tcctcagccc aggtggaaagg tggcgccat agcctccatt cgtatgagaa gcccgttttc	1560
	<b>tga</b>	<b>1563</b>

40

	<210> 14
45	<211> 520
	<212> PRT
	<213> <i>Homo sapiens</i>
50	<220>
	<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)
	<222> (2)..(7)
55	<223> his tag
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICION DE TRANSCRIPCIÓN)
60	<222> (155)..(155)
	<223> mutación
	<220>
65	<221> INICIO DE TRANSCRIPCIÓN (CARACTERÍSTICS MISCELÁNEAS)
	<222> (159)..(159)

# ES 2 322 477 T3

<223> mutación

<400> 14

5

Met His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr  
1 5 10 15

10 Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys  
20 25 30

15 Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile  
35 40 45

20 Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys  
50 55 60

25 Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr  
65 70 75 80

30 Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe  
85 90 95

35 Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys  
100 105 110

Val Lys Lys Tyr Glu Gln Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser  
115 120 125

40 Pro Lys Asp Arg Val Arg Asp Val Phe Glu Ala Lys Ala Arg His Gly  
130 135 140

45

50

55

60

65

# ES 2 322 477 T3

145                  150                  155                  160

5            Val Gly Ile Ile Ser Ser Arg Asp Ile Asp Phe Leu Lys Glu Glu  
               165                              170                              175

10            His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val  
               180                              185                              190

15            Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln  
               195                              200                              205

20            Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu  
               210                              215                              220

25            Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro  
               225                              230                              235                              240

30            Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile  
               245                              250                              255

35            Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala  
               260                              265                              270

40            Gly Val Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe  
               275                              280                              285

45            Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln  
               290                              295                              300

50            Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile  
               305                              310                              315                              320

55            Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile  
               325                              330                              335

60            Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala  
               340                              345                              350

65            Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile  
               355                              360                              365

55

60

65

ES 2 322 477 T3

Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala  
370 375 380

5

Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr  
385 390 395 400

10 Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys  
405 410 415

15 Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser  
420 425 430

20 Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly  
435 440 445

25 Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro  
450 455 460

Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe  
485 490 495

30 Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu  
500 505 510

35 His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe  
515 520

40 <210> 15  
<211> 1563  
<212> DNA

45 <213> *Homo sapiens*

<220>  
<221> mutación

50 <222> (4)..(21)  
<223> inserción

<220>  
<221> características misceláneas (inicio de transcripción)

55 <222> (350)..(555)  
<223> subdominio

60

# ES 2 322 477 T3

<400> 15

5	atgcatcacc atcaccatca cgccgactac ctgattagtg gggcacgtc ctacgtgcc gacgacggac tcacagcaca gcagcttcc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac tttctcattc tccctggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgct 10 ctgacccaaga aaatcactct taagaccccctt ctggtttccctt cteccatggaa cacagtcaca gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acaggcggtt ttggcttcat ccaccacaac tgtacacctg aattccagge caatgaagtt cggaaaagtga agaaatatga acagggatcc 15 atcacagacc ctgtggctt cagccccaaag gatcgctgc gggatgtttt tgaggccaag gccccgcattt gtttctgcgg tatcccaatc acagacacag gccgatggg gagccgcttg gtggccatca tctctccga agacatttat tttctcgagg aggaggaaca tgactgtttc 20 ttggaaagaga taatgacaaa gagggaaagac ttgggtggtag cccctgcagg catcacactg aaggaggcaa atgaaattct gcagcgcagc aagaaggaa agttgcccatt tgtaatgaa gatgatgagc ttgtggccat cattggcccg acagacactga agaagaatcg ggactaccca 25 cttagcccttca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag gatgacaagt ataggctgga cttgtctgc caggctgggtg tggatgttagt ggttttggac tcttccagg gaaattccat cttccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac 30 cctaattctcc aagtcatgg aggcaatgtg gtcactgctg cccaggccaa gaaccttatt gatgcagggtg tggatgcccgc gcccccaagca acagcagtgt acaaggtgtc agagtatgca gaagtgtctgg cctgtggcg gcccccaagca acagcagtgt acaaggtgtc agagtatgca 35 cggcgctttt gtttccggat cattgtctgtat ggaggaatcc aaaatgtggg acatattgc aaagcccttgg cccttggggc cttccacagac atgatgggtt ctctcttgcc tgccaccact gaggccccctg gtgaataactt ctttccgat gggatccggc taaagaaaata tcgcggatgt 40 ggttctctcg atgcccatttca caagcacccctc agcagccaga acagatattt cagtgaagct gacaaaatca aagtggccca gggagtgctt ggtgtgtgc aggacaaaagg gtcataatccac aaatttgcctt cttacactgtat tgctggcatc caacactcat gccaggacat tggtgccaaag 45 agcttgaccc aagtccgagc catgtatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 960 1020 1080 1140 1200 1260 1320 1380 1440 1500  1560 1563
---	---	---

55

<210> 16  
<211> 520  
<212> PRT  
60 <213> *Homo sapiens*

<220>

65 <221> CONDICIONES MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)  
<222> (2)..(7)  
<223> his tag

ES 2 322 477 T3

<220>

<221> CONDICIONES MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

<222> (167)..(167)

5 <223> mutation

<220>

10 <221> CONDICIONES MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

<222> (173)..(173)

<223> mutación

15 <400> 16

20 Met His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr  
1 5 10 15

Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys  
20 25 30

25 Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile  
35 40 45

30 Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys  
50 55 60

35 Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr  
65 70 75 80

40 Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe  
85 90 95

Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys  
100 105 110

45

50

55

60

65

ES 2 322 477 T3

Val Lys Lys Tyr Glu Gln Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser  
115 120 125

5 Pro Lys Asp Arg Val Arg Asp Val Phe Glu Ala Lys Ala Arg His Gly  
130 135 140

10 Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Arg Met Gly Ser Arg Leu  
145 150 155 160

15 Val Gly Ile Ile Ser Ser Glu Asp Ile Asp Phe Leu Glu Glu Glu  
165 170 175

His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val  
180 185 190

20 Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln  
195 200 205

25 Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu  
210 215 220

30 Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro  
225 230 235 240

Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile  
245 250 255

35 Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala  
260 265 270

40 Gly Val Asp Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe  
275 280 285

45 Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln  
290 295 300

Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile  
305 310 315 320

50

55

60

65

ES 2 322 477 T3

Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile  
325 330 335

5 Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala  
340 345 350

10 Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile  
355 360 365

15 Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala  
370 375 380

20 Leu Gly Ala Ser Thr Asp Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr  
385 390 395 400

25 Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys  
405 410 415

30 Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser  
420 425 430

35 Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly  
435 440 445

40 Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro  
450 455 460

45 Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys  
465 470 475 480

50 Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe  
485 490 495

55 Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu  
500 505 510

60 His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe  
515 520

50 <210> 17  
<211> 1563  
<212> DNA  
<213> *Homo sapiens*

55 <220>  
<221> mutación  
<222> (4)..(21)

60 <223> inserción

65 <220>  
<221> características misceláneas (inicio de transcripción)  
<222> (350)..(555)  
<223> subdominio

# ES 2 322 477 T3

<400> 17  
atgcatcacc atcaccatca cgccgactac ctgatttagtg ggggcacgtc ctacgtgcc 60  
gacgacggc tcacagcaca gcagctttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac 120  
5 tttctcattc tccctggta categacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgct 180  
ctgaccaaga aaatcactct taagaccccctt ctgggtttctt ctccccatgga cacagtac 240  
gaggctggaa tgccatagc aatggcgctt acaggcgta ttggcttcat ccaccacaac 300  
10 tgtacacctg aattccaggc caatgaagttt cggaaagtga agaaatatga acagggattc 360  
atcacagacc ctgtggcttctt cagcccaag gatgcgtgc gggatgttt tgaggccgaa 420  
gccgagcatg gtttctgccc tatcccaatc acagacacag gccggatggg gagccgctt 480  
15 gtggcatca tctccctccag ggacattgtt tttctcaag aggaggaaca tgactgttc 540  
ttggaaagaga taatgacaaa gagggaaagac ttggtggttag cccctgcagg catcacactg 600  
aaggaggcaa atgaaattctt gcagcgcagc aagaaggaa agttggccat tggaaatgaa 660  
20 gatgatgagc ttgtggccat cattgcccgg acagacctga agaagaatcg ggactaccca 720  
ctagcctcca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag 780  
gatgacaagt ataggctgga cttgtcgcc caggctggtg tggatgttagt ggtttggac 840  
25 tcttccagg gaaattccat cttccagatc aatatgtca agtacatcaa agacaaatac 900  
cctaattctcc aagtcatgttgg aggcaatgtt gtcactgtgc cccaggccaa gaacctcatt 960  
gatgcagggtg tggatgtccctt gcgggtgggc atggaaatgt gtcacatgtc cattacgcag 1020  
30 gaagtgttgg cctgtggcg gccccaaagca acagcagtgt acaagggtgtc agagtatgca 1080  
cggcgctttg gtgttccggat cattgtgtatggg ggagaaatcc aaaatgtggg tcatattgtcg 1140  
aaagccttgg cccttgggc ctccacagtc atgtgggtt ctctcttggc tgccaccact 1200  
35 gaggccccctg gtgaataactt cttttccgtt gggatccggc taaagaaata tgcgggtatg 1260  
ggtttctctcg atgcatgga caagcaccc tc agcagccaga acagatattt cagtgaagct 1320  
gacaaaaatca aagtggccca gggagtgtctt ggtgtgtgc aggacaaagg gtcaatccac 1380  
40 aaatttgtcc cttacctgtat tgctggcattc caacactcat gccaggacat tggtgccaaag 1440  
agcttgcacc aagtccgacg catgtgtac tctggggagc ttaagttgttga gaagagaacg 1500  
tcttcagcccc aggtggaaagg tggcgccat agcctccattt cgtatgagaa gcggctttc 1560  
45 tga 1563

<210> 18

<211> 520

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

55 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

<222> (2). (7)

<223> his tag

60 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

<222> (140)..(140)

65 <223> mutación

<220>

# ES 2 322 477 T3

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

<222> (142)..(142)

<223> mutación

5

<400> 18

Met His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr  
1 5 10 15

10

Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys  
20 25 30

15

Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile  
35 40 45

20

Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys  
50 55 60

25

Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr  
65 70 75 80

Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe  
85 90 95

30

Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys  
100 105 110

35

Val Lys Lys Tyr Glu Gln Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser  
115 120 125

Pro Lys Asp Arg Val Arg Asp Val Phe Glu Ala Glu Ala Glu His Gly  
130 135 140

40

Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Arg Met Gly Ser Arg Leu  
145 150 155 160

45

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

50

His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val  
180 185 190

Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln  
195 200 205

55

Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu  
210 215 220

60

Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Asn Arg Asp Tyr Pro  
225 230 235 240

Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile  
245 250 255

65

Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala  
260 265 270

Gly Val Asp Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe

ES 2 322 477 T3

<210> 19

<211> 1563

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

60 <220>

## <221> mutación

<222> (4)..(21)

<223> inserción

65

<220>

## <221> CARACT

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

# ES 2 322 477 T3

<222> (350)..(555)

<223> subdominio

5 <400> 19

	atgcattcacc atcaccatac cgccgactac ctgatttagtggggcacgtc ctacgtgc	60
	gacgacggac tcacagcaca gcagcttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac	120
10	tttctcattc tccctggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgt	180
	ctgaccaaga aaatcactt taagacccccttgggtttcccttccatggacacatcaca	240
	gaggctggta tggccatagc aatggcgctt acaggcgta ttggcttcat ccaccacaac	300
15	tgtacacctg aattccaggc caatgaagtt cggaaagtga agaaatatga acaggattc	360
	atcacagacc ctgtggctt cagccccaaag gatcgctgc gggatgttt tgaggccaag	420
	gccggcatg tttctgcgg tatcccaatc acagacacag gccggatggg gagcccttg	480
20	gtggcatac tctccatccga agacattgtat tttctcgagg aggaggaaca tgaactgtttc	540
	tttggaaagataaatgacaaa gaggaaagac ttgggtgttag cccctgcagg catcacactg	600
	aaggaggcaa atgaaattctt gcagcgccgc aagaagggaa agttgcctatgtttaatgaa	660
25	gatgtatgac ttgtggccat cattggccgg acagacactga agaagaatcg ggactaccca	720
	ctagcctcca aagatgcca gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag	780
	gatgacaagt ataggctgga cttgtcgcc caggctggtg tggatgttagt gggttggac	840
30		
	tcttcccagg gaaattccat cttccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac	900
	cctaattctcc aagtcatgttgg agccaatgtg gtcaactgtgc cccaggccaa gaaccttatt	960
35	gatgcagggtg tggatgcctt gccccggatggatggatgt gctccatctg cattacgcag	1020
	gaagtgttgg cctgtggggcg gccccaaagca acagcagtgt acaagggtgtc agagtatgca	1080
	cgccgccttg gtgttccgtt cattgtgtatggatggatcc aaaaatgtggg tcatattgcg	1140
40	aaagccttgg cccttggggc ctccacagtc atgatggctt ctctcttggc tgccaccact	1200
	gaggccccctg gtgaataactt cttttccgtat gggatccggc taaagaaata tcgcgttatg	1260
	ggttctctcg atgcatggca caagcaccc tc acgcaggccaga acagatattt cagtgaagct	1320
45	gacaaaatca aagtggccca gggagggtctt ggtgtgtgc aggacaaagg gtcaatccac	1380
	aaatttgcctt cttacactgtat tgctggcatacactcat gccaggacat tggtgccaaag	1440
	agcttgaccc aagtccgagc catgtgtac tctggggagc ttaagttga gaagagaacg	1500
50	tcctcagccc aggtggaaagg tggcgccat agcctccatt cgtatgagaa gcccgttttc	1560
	<b>tga</b>	1563

55 <210> 20

<211> 520

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

65 <222> (2)..(7)

<223> his tag

# ES 2 322 477 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

<222> (167)..(167)

5 <223> mutación

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

<222> (173)..(173)

<223> mutación

15 <400> 20

Met His His His His His Ala Asp Tyr Leu Ile Ser Gly Gly Thr  
1 5 10 15

20 Ser Tyr Val Pro Asp Asp Gly Leu Thr Ala Gln Gln Leu Phe Asn Cys  
20 25 30

25 Gly Asp Gly Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Ile  
35 40 45

30 Asp Phe Thr Ala Asp Gln Val Asp Leu Thr Ser Ala Leu Thr Lys Lys  
50 55 60

35 Ile Thr Leu Lys Thr Pro Leu Val Ser Ser Pro Met Asp Thr Val Thr  
65 70 75 80

40 Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe  
85 90 95

45 Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys  
100 105 110

50 Val Lys Lys Tyr Glu Gln Gly Phe Ile Thr Asp Pro Val Val Leu Ser  
115 120 125

55 Pro Lys Asp Arg Val Arg Asp Val Phe Glu Ala Lys Ala Arg His Gly  
130 135 140

60 Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Arg Met Gly Ser Arg Leu  
145 150 155 160

65 Val Gly Ile Ile Ser Ser Glu Asp Ile Asp Phe Leu Glu Glu Glu  
165 170 175

70 His Asp Cys Phe Leu Glu Glu Ile Met Thr Lys Arg Glu Asp Leu Val  
180 185 190

75 Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln  
195 200 205

80 Arg Ser Lys Lys Gly Lys Leu Pro Ile Val Asn Glu Asp Asp Glu Leu  
210 215 220

85 Val Ala Ile Ile Ala Arg Thr Asp Leu Lys Lys Asn Arg Asp Tyr Pro  
225 230 235 240

# ES 2 322 477 T3

	Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile			
	245	250	255	
5	Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala			
	260	265	270	
10	Gly Val Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe			
	275	280	285	
15	Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln			
	290	295	300	
20	Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile			
	305	310	315	320
	Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile			
	325	330	335	
25	Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala			
	340	345	350	
30	Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile			
	355	360	365	
	Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala			
	370	375	380	
35	Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr			
	385	390	395	400
40	Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys			
	405	410	415	
	Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser			
	420	425	430	
45	Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly			
	435	440	445	
50	Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro			
	450	455	460	
55	Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys			
	465	470	475	480
	Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe			
	485	490	495	
60	Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu			
	500	505	510	
65	His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe			
	515	520		

ES 2 322 477 T3

<210> 21  
 <211> 1563  
 <212> DNA  
 5 <213> *Homo sapiens*  
 <220>  
 <221> mutación  
 10 <222> (4)..(21)  
 <223> inserción  
 15 <220>  
 <221> características misceláneas (inicio de transcripción)  
 <222> (350)..(555)  
 <223> subdominio  
 20 <400> 21

	atgcatcacc atcaccatca cgccgactac ctgatttagtg ggggcacgtc ctacgtgccaa	60
25	gacgacggac tcacagcaca gcagcttcc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac	120
	tttctcatcc tccctggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgct	180
	ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctggtttctt ctcctatgga cacagtcaca	240
30	gaggctggaa tggccatagc aatggcgctt acaggcggtt ttggcttcat ccaccacaaac	300
	tgtacacctg aattccaggc caatgaagt cggaaagtga agaaatatga acagggattc	360
	atcacagacc ctgtggtcct cagccccgaa gatgaggtgg aagatgttt tgaggccgaa	420
35	gccgagcatg gtttctgccc tatcccatac acagacacag gcaaattggg aagcgagtt	480
	gtgggcatca tctctccag ggacattgat ttttcaaaag aggaggaaca tgactgtttc	540
	ttggaagaga taatgacaaa gagggaaagac ttgggtggtag cccctgcagg catcacactg	600
40	aaggaggcaa atgaaattct gcagcgccgc aagaaggaa agttggccat tgtaaatgaa	660
	gatgatgagc ttgtggccat cattggccgg acagacactg agaagaatcg ggactaccca	720
	ctagcctcca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag	780
45	gatgacaagt ataggctgga cttgtcgcc caggctggtg tggatgttagt gggtttggac	840
	tcttccagg gaaattccat cttccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac	900
	cctaattcc aagtcatgg aggcaatgtg gtcaactgtg cccaggccaa gaacctcatt	960
50	gatgcaggtg tggatgcct gcgggtgggc atggaaagtgc gtcacatgtg cattacgcag	1020
	gaagtgtctgg cctgtggcg gccccaaagca acagcagtgt acaaggtgtc agagtatgca	1080
	cgccgttttg gtgtccggcattgtgtat ggaggaatcc aaaatgtggg tcatattgcg	1140
55	aaagccctgg cccttggggc ctccacagtc atgatggct ctctctggc tgccaccact	1200
	gaggccccctg gtgaaatactt cttttccgtat gggatccggc taaagaaata tcgcccgtatg	1260
	ggttctctcg atgcccattgga caagcaccc tc agcagccaga acagatattt cagtgaagct	1320
60	gacaaaatca aagtggccca gggagtgtct ggtgtgtgc aggacaaagg gtcaatccac	1380
	aaatttgcctt cttacactgtat tgctggcattt caacactcat gccaggacat tggtgccaaag	1440
	agcttgaccc aagtccgagc catgtgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg	1500
65	tccttcaagccc aggtggaaagg tggcgccat agcttccattt cgtatgagaa gcccgttttc	1560
	tga	1563

<210> 22  
<211> 520  
<212> PRT  
5 <213> *Homo sapiens*

<220>  
10 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)  
<222> (2)..(7)  
<223> his tag

15 <220>  
<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)  
<222> (130)..(130)  
<223> mutación  
20

<220>  
25 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)  
<222> (132)..(132)  
<223> mutación

<220>  
30 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)  
<222> (134)..(134)  
<223> mutación

35 <220>  
<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)  
<222> (140)..(140)  
40 <223> mutation

<220>  
45 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)  
<222> (142)..(142)  
<223> mutación

<220>  
50 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)  
<222> (155)..(155)  
<223> mutación

55 <220>  
<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)  
<222> (159)..(159)  
60 <223> mutación

# ES 2 322 477 T3

<400> 22

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

ES 2 322 477 T3

Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile  
305 310 315 320

5 Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile  
325 330 335

10 Cys Ile Thr Gln Glu Val Leu Ala Cys Gly Arg Pro Gln Ala Thr Ala  
340 345 350

15 Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile  
355 360 365

20 Ala Asp Gly Gly Ile Gln Asn Val Gly His Ile Ala Lys Ala Leu Ala  
370 375 380

25 Leu Gly Ala Ser Thr Val Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr  
385 390 395 400

30 Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys  
405 410 415

35 Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser  
420 425 430

40 Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly  
435 440 445

45 Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro  
450 455 460

50 Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys  
465 470 475 480

Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe  
485 490 495

Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu  
500 505 510

55 His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe  
515 520

60

65