



19



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 secuencia 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 antipsoriático, 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.

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.

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.

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 cargado. 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, 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.

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 de histidina-tag, se mantiene de una forma relativa al polipéptido de IMPDH del tipo salvaje.

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.

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 estrictas a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos presentadas en las SEQ ID NO:13, 15, 17, 19 ó 21.

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 estrictas, 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.

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

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 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.

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 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).

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.

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.

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

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 substituciones de aminoácidos, en el subdominio, se encuentran en bastardilla.

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).

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 substituciones de aminoácidos, en el subdominio, se encuentran en bastardilla.

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).

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 substituciones de aminoácidos, en el subdominio, se encuentran en bastardilla.

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

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 substituciones de aminoácidos, en el subdominio, se encuentran en bastardilla.

La figura 16, muestra la secuencia de aminoácidos de la IMPDH humana del tipo II (Δ 2 + I A) + AH clon B (SEQ ID NO:21).

Las figuras 17 A y B, muestran la secuencia de aminoácidos deducida de la IMPDH humana del tipo II (Δ 2 + 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 substituciones de aminoácidos, en el subdominio, se encuentran en bastardilla.

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)(\blacktriangle , \square) ó R1 F(+, Ж) y se sometió a test de ensayo a 4°C (\blacktriangle , +) y a 25°C (\square , Ж).

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 (□, ✕).

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 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 2B + 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 (□, ✕).

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 (Δ 3 + 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 + 1A) + 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 (□, ✕).

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 (□, ✕).

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 (□, ✕).

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 (Δ 2 + 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

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, 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.

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, con relación a los polipéptidos de IMPDH del tipo salvaje (véanse las páginas 18 - 24).

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.

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-

ticos, y pueden formar un multímero (por ejemplo un homotetrámero), 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.

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 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.

La letra individual, codifica para los aminoácidos, de la siguiente forma: A = alanina, R = arginina, N = asparagina, D = ácido aspártico, C = cisteína, 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.

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 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.

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 expresado 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.

“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, 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).

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: 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).

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,

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.

Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico que codifican a la IMPDH del tipo I ó II, que pueden modificarse en la 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, 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.

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 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.

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 n° 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).

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.

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", 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).

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)).

En todavía otra forma de presentación, se aíslan 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", 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001).

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

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).

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 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).

Las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos de IMPDH modificados, provistos de IMPDH, resultantes, se denominan $\Delta 2B + AH$ 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. 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 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 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).

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 contenían 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 $\Delta 2B + AH$ 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, tienen los números de acceso de la TCC, de PTA-5787, PTA-5786, PTA 5782, PTA-5784, PTA-5785, y PTA-5783, respectivamente.

Así, de este modo, se proporciona una molécula aislada de ácido nucleico. La 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 SEQ ID NO:13, 15, 17, 19 ó 21.

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 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.

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 autónomamente 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

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 α), 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 glicólicas, 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 immortalizada, 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. Nat. Acad. Sci. 91:3224-7 (1994), y patente estadounidense U.S. n° 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. n° 6.4651.572 y en la publicación del documento de prioridad PCT de la patente internacional correspondiente a la publicación n° 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 replicación (ColEI), 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 nucleótidos 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 pkk117 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 aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica. Tales tipos de procedimientos, incluyen a la electroporación, transformación de protoplastos, microinyección, transfección mediatizada por virus, transfección mediatizada por CaPO_4 , transfección mediatizada por DEAE-dextrano, lipofección, y shock de CaCl_2 . 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 -, 3ª Edición, Cold Spring 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, pueden cultivarse y, las células huésped bacterianas en el cultivo, pueden lisarse, por ejemplo, mediante sonicación (sometimiento a ultra-sonidos), calor, o tratamiento químico, tal como con lisosoma o un detergente, para liberar el DNA, y puede centrifugarse el homogenato, para retirar los residuos de células. El DNA, puede aislarse 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 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, posteriormente, abajo. A continuación, se procede a lisar las células cultivadas, por ejemplo, mediante sonicación (tratamiento a ultrasonidos), calor, o tratamiento químico, tal como con lisosima o con un detergente, para liberar el polipéptido expresado, 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 enlazan 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 enteroquinasa y, los polipéptidos modificados de IMPDH, pueden purificarse a partir de la tag liberada, utilizando cualquiera de las técnicas convencionales anteriormente descritas, 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” -, 3ª Edición, Spriger-Verlag (1994). Debe entenderse el hecho de que, los procedimientos de purificación descritos anteriormente, arriba, para la purificación de polipéptidos modificados de IMPDH, provistos de histidina-tag, o para la purificación de polipéptidos de IMPDH del tipo salvaje, provistos de histidina-tag, no son limitativos, y pueden utilizarse cualesquiera 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 tipo 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.

50 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, expresado en la célula huésped transformada. Se proporciona, también, un polipéptido modificado de IMPDH, producido mediante este procedimiento.

60 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.

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)).

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, polietilenglicol, EDTA, otras proteínas, detergentes y por el estilo). Los polipéptidos modificados de IMPDH, pueden almacenarse a una temperatura de 4°C, ó pueden 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. n° 6.107.052 y U.S. n° 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.

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. 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 sustrato 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.

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.

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.

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')₂, 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 pueden utilizarse para la purificación de IMPDH.

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

Formas específicas de presentación

Ejemplo 1

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

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

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 µl de DNA del pKK117, de doble hebra, con la secuencia de IMPDH II insertada en el plásmido (los 2 µl de volumen, contenían 5, 10, 20 ó 50 ng de DNA del plásmido, en tampón TE), 5 µl de 10X tampón de reacción, 125 ng de cada cebador en tampón TE (µl de cada uno, 1 µl de dNTP mix, y ddH₂O (37 µl). Se procedió a añadir Pfu Turbo-DNA polimerasa (2,5 U/µl; 1 µl), con objeto de conseguir un volumen final de 50 µl, y cada región, se cubrió con 30 µl 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, 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 µl 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 un transcurso de tiempo de 1 hora, para digerir el DNA plásmido. El Dpn I, digiere el DNA plásmido no mutado,
 25 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 µl), en tubos de propileno preenfriados del tipo Falcon 2059. Se procedió a transferir un alícuoto (1 µl) del DNA digerido de Dpn I, procedente de cada muestra y, el tubo de muestra, se transfirió a alícuotos separados de células supercompetentes. Las reacciones de transformación, se mezclaron e incubaron a una temperatura de 4°C, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. Las mezclas de reacción, se calentaron, a continuación, a una temperatura de 42°C, durante
 35 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 µl), sobre placas de agar de LB, con X-gal e IPTG con µg/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 una 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 µg/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 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
 55 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).

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, Δ2B + AH clon A, (Δ3 + 1A) + AH clon A, Δ 1,2A + AH clon B, Δ 3B + AH clon B y (Δ2 + 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,

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.

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.

Ejemplo 2

Transformación de *E. coli* H712

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.

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_{600 nm}, 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 MgCl₂). Se prepararon alícuotos 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.

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 alícuotos (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.

Ejemplo 3

Expresión de IMPDH, utilizando *E. coli* H712

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.

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. n° 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. n° 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 NaPO₄, 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 minutos, 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.

Tampones

20 *Tampón de dilución de la muestra*

20 mM NaPO₄, 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 NaPO₄, 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 NaPO₄, 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 NaPO₄, 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 NaPO₄, 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 NaPO₄, 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 NaPO₄, 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.

60

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

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 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 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) 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:

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

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.

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% Suttocide 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% Suttocide 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% Suttocide A, pH 8,0.

5 R2: 2,5 mM NAD, 0,0175% NP40, y 0,05% Suttocide 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% Suttocide 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.

10 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.

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

Procedimiento de ensayo enzimático

20 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 $t = 0,4^{\circ}\text{C}$, 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:

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

Longitud de onda primaria: 340 nm.

Longitud de onda secundaria: 700 nm.

30 Volumen de la muestra: 2 μl .

Volumen de R1: 167 μl .

35 Volumen de R2: 33 μl .

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.

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.
3. El polipéptido modificado de IMPDH de la reivindicación 1, que tiene la secuencia de aminoácidos según se muestra en cualquiera de las SEQ ID NOS: 14, 16, 18, 20 ó 22.
- 15 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.
- 20 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.
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.
- 25 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
 - (b) recuperar el citado polipéptido modificado de IMPDH producido.
- 35 8. El polipéptido modificado de IMPDH, producido mediante el procedimiento de la reivindicación 7.
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.
- 40 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, hibrida 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.
14. Un vector que comprende la molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 12.
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, hibrida, 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.

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.

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.

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 *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.

FIGURA 1

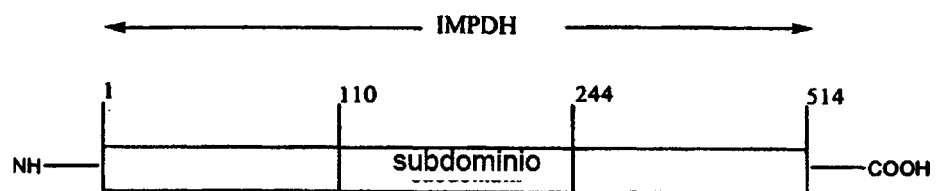


FIGURA 2

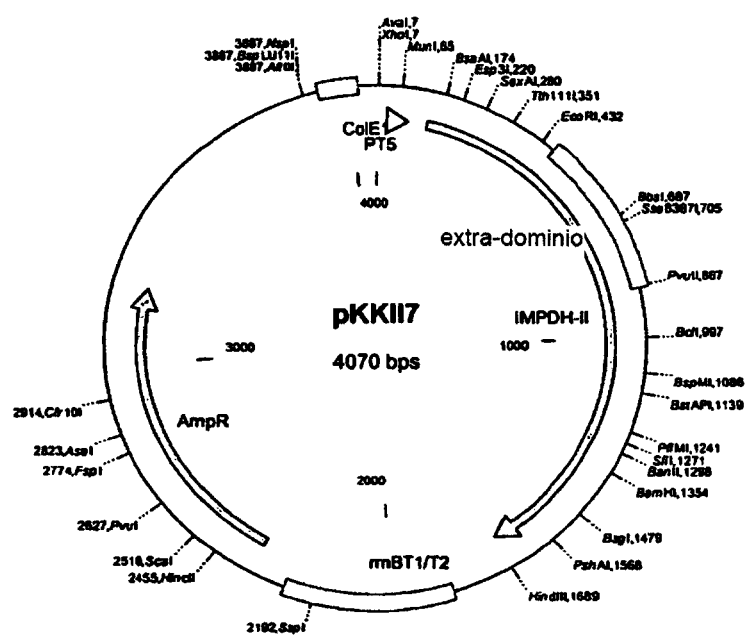


FIGURA 3

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

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

FIGURA 4

atggccgact acctgattag tgggggcacg tcctacgtgc cagacgacgg actcacagca	60
cagcagctct tcaactgcgg agacggcctc acctacaatg actttctcat tctccctggg	120
tacatcgact tcaactgcaga ccagggtggac ctgacttctg ctctgaccaa gaaaatcact	180
cttaagaccc cactggtttc ctctcccatg gacacagtca cagaggctgg gatggccata	240
gcaatggcgc ttacaggcgg tattggcttc atccaccaca actgtacacc tgaattccag	300
gccaatgaag ttcggaagt gaagaaatat gaacagggat tcatcacaga ccctgtggtc	360
ctcagcccca aggatcgct ggggatgtt ttgaggcca aggcccgca tggtttctgc	420
ggtatcccaa tcacagacac aggccggatg gggagccgct tggtaggcat catctcctcc	480
agggacattg attttctcaa agaggaggaa catgactgtt tcttgggaaga gataatgaca	540
aagagggaag acttgggtgt agccctgca ggcatcacac tgaaggaggc aaatgaaatt	600
ctgcagcgca gcaagaagg aaagtgtccc attgtaaatg aagatgatga gcttgtggcc	660
atcattgccc ggacagacct gaagaagaat cgggactacc cactagcctc caaagatgcc	720
aagaaacagc tgctgtgtgg ggcagccatt ggcactcatg aggatgacaa gtataggctg	780
gacttgctcg cccaggctgg tgtggatgta gtggttttgg actcttccca gggaaattcc	840
atcttccaga tcaatatgat caagtacatc aaagacaaat accctaattct ccaagtcatt	900
ggaggcaatg tggctactgc tgcccaggcc aagaacctca ttgatgcagg tgtggatgcc	960
ctgcgggtgg gcatgggaag tggctccatc tgcattacgc aggaagtgtc ggcctgtggg	1020
cggccccaag caacagcagt gtacaagggtg tcagagtatg cagggcgctt tgggtgtccg	1080
gtcattgctg atggaggaat ccaaaatgtg ggtcatattg cgaaagcctt ggccttggg	1140
gcctccacag tcatgatggg ctctctcctg gctgccacca ctgaggcccc tggatgaatac	1200
ttcttttccg atgggatccg gctaaagaaa tatcgcggtg tgggttctct cgatgccatg	1260
gacaagcacc tcagcagcca gaacagatat ttcagtgaag ctgacaaaat caaagtggcc	1320
caggagtggt ctggtgctgt gcaggacaaa gggccaatcc acaaatgtgt cccttacctg	1380
attgctggca tccaacactc atgccaggac attggtgcca agagcttgac ccaagtccga	1440
gccatgatgt actctgggga gcttaagttt gagaagagaa cgtcctcagc ccagggtgaa	1500
ggtagcgctc atagcctcca ttcgtatgag aagcggcttt tctga	1545

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 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

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	Gln	Val	Glu	Gly	Gly	Val	His	Ser	Leu	His	Ser	Tyr	Glu	Lys	Arg	
		500						505					510			
Leu	Phe															

FIGURA 6

```

atgcacacc atcaccatc a cgcgactac ct gattagt ggggca cgtc ctacgtgcc 60
gacgacggac tcacagcac a gcagctcttc aa ctgcgag acggcc tcac ctacaatgac 120
tttctcattc tccctgggt a catcgacttc ac tgcagacc aggtgg acct gacttctgct 180
ctgaccaaga aaatcactc t taagaccca ct ggtttcct ctcca tggc cacagtccac 240
gaggctggga tggccatag c aatggcgctt ac aggcggta ttggct tcat ccaccacaac 300
tgtacacctg aattccagg c caatgaagt cg gaaagtga agaaat atga acagggattc 360
atcacagacc ctgtggtcc t cagccccaa g tgcgctgc gggatg tttt tgaggccaag 420
gcccggcatg gtttctgagg tatcccaatc ac agacacag gccgga tggg gagccgcttg 480
gtgggcatca tctcctccag ggacattgat tt tctcaaag agggagg aaca tgactgtttc 540
ttggaagaga taatgacaa a gagggaagac tt ggtggtag cccctg cagg catcacactg 600
aaggaggcaa atgaaattc t gcagcgagc aa gaaggga agttgc ccat tgtaantgaa 660
gatgatgagc ttgtggcca t cattgcccgg a cagacctga agaag aatcg ggactaccc a 720
ctagctcca aagatgcca a gaaacagctg ct gtgtgggg cagcca ttgg cactcatgag 780
gatgacaagt ataggctgg a cttgctcgcc ca ggcctggtg tggatg tagt ggttttggac 840
tcttcccagg gaaattcca t ctccagatc aa tatgatca agtaca tcaa agacaaatac 900
cctaattctcc aagtcattg g aggcaatgtg gt cactgctg cccagg ccaa gaacctcatt 960
gatgcaggtg tggatgccc t gcgggtgggc at ggggaagt gctcca tctg cattacgcag 1020
gaagtgcctg cctgtgggc g gccccaa gca ac agcagtg tacaagg tgc agagtatgca 1080
cggcgctttg gtgttccg t cattgctgat gg aggaatcc aaaatg tggg tcatattgag 1140
aaagccttg cccttgggg c ctccacagtc at gatgggct ctctcc tggc tgccaccact 1200
gaggccctg gtgaatact t cttttccgat gg gatccggc taaaga aata tcgcggtatg 1260
ggttctctcg atgccatgg a caagcacctc ag cagccaga acagat attt cagtgaagc t 1320
gacaaaatca aagtggccc a gggagtgtct gg tgctgtgc aggaca aagg gtcaatccac 1380
aaatttgtcc cttacctga t tgcctggcat ca acaactcat gccagg acat tgggtgccaag 1440
agcttgaccc aagtcagg c catgatgtac tc tggggagc ttaagt ttga gaagagaacg 1500
tcttcagccc aggtggaa gg tgggtccat a gcctccatt cgtat gagaa gcggctttt c 1560
tga 1563

```

FIGURA 7A

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

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		

FIGURA 8

```

atgcatcacc atcaccatca cgccgactac ctgattagtg ggggcacgtc ctacgtgcca 60
gacgacggac tcacagcaca gcagctcttc aactgcgag acggcctcac ctacaatgac 120
ttttctcatc tccccgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gactttctgct 180
ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctggtttctt ctcccatgga cacagtcaca 240
gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acaggcggtt ttggcttcat ccaccacaac 300
tgtacacctg aattccaggc caatgaagtt cggaaagtga agaaatatga acagggattc 360
atcacagacc ctgtggtcct cagccccaag gatcgcgctg gggatgtttt tgaggccaag 420
gccccgcatg gtttctgcgg tatcccaatc acagacacag gcgaaatggg aagcgagtty 480
gtgggcatca tctctccag ggacattgat tttctcaaag aggaggaaca tgactgtttc 540
ttggaagaga taatgacaaa gagggaagac ttggtggtag cccctgcagg catcacactg 600
aaggaggcaa atgaaattct gcagcgagc aagaaggga agttgccc atgtaaatgaa 660
gatgatgagc ttgtggccat cattgccgg acagacctga agaagaatcg ggactacca 720
ctagcctcca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag 780
gatgacaagt ataggctgga cttgctcgcc caggctggtg tggatgtagt ggttttggac 840
tcttcccagg gaaattccat cttccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatc 900
cctaattctc aagtcattgg aggcaatgtg gtcactgctg cccaggccaa gaacctcatt 960
gatgcaggtg tggatgccct ggggtgggc atgggaagtg gctccatctg cattacgcag 1020
gaagtgcctg cctgtgggcy gcccgaagca acagcagtg acaagggtgc agagtatgca 1080
cggcgcttgg gtgttccggt cattgctgat ggaggaatcc aaaatgtggg tcatattgcy 1140
aaagccttgg cccttggggc ctccacagtc atgatgggct ctctcctggc tgccaccact 1200
gaggccccct gtgaatactt ctttctcgat gggatccggc taaagaaata tcgcggtatg 1260
ggttctctcg atgccatgga caagcacctc agcagccaga acagatattt cagtgaagct 1320
gacaaaatca aagtggccca gggagtgtct ggtgctgtgc aggacaaagg gtcaatccac 1380
aaatttgtcc cttacctgat tgctggcatc caacactcat gccaggacat tggtgccaag 1440
agcttgaccc aagtcggagc catgatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg 1500
tctcagccc aggtggaagg tggcgccat agcctccatt cgtatgagaa gcggcttttc 1560
tga 1563

```

FIGURA 9A

Met	His	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	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	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	

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		

FIGURA 10

atgcatcacc atcaccatca cgcgactac ctgattagtg ggggcacgtc ctacgtgcca	60
gacgacggac tcacagcaca gcagctcttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac	120
tttctcattc tccctgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgct	180
ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctgggtttcct ctcccatgga cacagtccca	240
gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acaggcggtg ttggcttcac ccaccacaac	300
tgtacacctg aattccaggc caatgaagtt cggaaagtga agaatatga acagggaattc	360
atcacagacc ctgtggtcct cagccccaag gatcgctgctc gggatgtttt tgaggccaag	420
gccccgcatg gtttctgcgg tatcccaatc acagacacag gccggatggg gagcgccttg	480
gtgggcatca tctcctccga agacattgat tttctcgagg aggaggaaca tgactgtttc	540
ttggaagaga taatgacaaa gagggaagac ttggtggtag ccctgcagg catcacactg	600
aaaggaggcaa atgaaattct gcagcgagc aagaaggga agttgcccac tgtaaatgaa	660
gatgatgagc ttgtggccat cattgcccgg acagacctga agaagaatcg ggactacca	720
ctagcctcca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag	780
gatgacaagt ataggctgga ctgtctgcc caggctggtg tggatgtagt ggttttggac	840
tcttcccagg gaaattccat ctccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac	900
cctaattctc aagtcattgg aggcaatgtg gtcactgctc cccaggccaa gaacctcatt	960
gatgcagggt tggatgccct gcgggtgggc atgggaagtg gctccatctg cattacgcag	1020
gaagtgtctg cctgtgggct gccccaaagc acagcagtg acaagggtgc agagtatgca	1080
cggcgctttg gtgttccggc cattgctgat ggaggaatcc aaaatgtggg acatattgcg	1140
aaagccttgg ccttgggggc ctccacagac atgatgggct ctctcttggc tgccaccact	1200
gaggccctg gtgaatactt cttttccgat gggatccggc taaagaaata tcgcggtatg	1260
ggttctctcg atgccatgga caagcacctc agcagccaga acagatatct cagtgaagct	1320
gacaaaatca aagtggccca gggagtgtct ggtgctgtgc aggacaaagg gtcaatccac	1380
aaatttgtcc cttacctgat tgctggcatc caacactcat gccaggacat tggtgccaag	1440
agcttgacct aagtccgagc catgatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg	1500
tcctcagccc aggtggaagg tggcgcccat agcctccatt cgtatgagaa gcggcttttc	1560
tga	1563

FIGURA 11A

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	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	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

FIGURA 12

```

atgcacaccc atcaccatca cgcgcgactac ctgattagtg gggggca cgtc ctacgtgcca      60
gacgacggac tcacagcac a gcagctcttc a actgctggag acggc ctcac ctacaatga c    120
tttctcattc tccctgggt a catcgacttc ac tgcagacc aggtggacct gactttctgct    180
ctgaccaaga aaatcactc t taagacccca ct ggttttcct ctcccatgga cacagtcaca    240
gaggctggga tggccatag c aatggcgctt ac aggcggta ttggct tcac ccaccacaac    300
tgtacacctg aattccagg c caatgaagt cg gaaagtga agaat atga acagggattc    360
atcacagacc ctgtggtcc t cagccccaa g a tgcgtg c gggatg tttt tgaggccgaa    420
gccgagcatg gttctgctg g tatcccaatc ac agacacag gccgga tggg gagccgcttg    480
gtgggcatca tctctcca g ggacattgat tt tctcaaag aggagg aaca tgactgtttc    540
ttggaagaga taatgacaa a gagggagac tt ggtggtag cccctg cagg catcacactg    600
aaggaggcaa atgaaattc t gcagcgagc aa gaaggga agttgc ccat tgtaaatgaa    660
gatgatgagc ttgtggcca t cattgcccg ac agacctga agaaga atcg ggactaccc a    720
ctagcctcca aagatgcca a gaaacagctg ct gtgtggg cagcca ttgg cactcatgag    780
gatgacaagt ataggctgg a cttgctcgcc ca ggcctggg tggatg tagt ggttttggac    840
tcttcccagg gaaattcca t cttccagatc aa tatgatca agtaca tcaa agacaaatc    900
cctaattctc aagtcattg g aggcaatgtg gt cactgctg cccaggccaa gaacctcatt    960
gatgcagggtg tggatgccc t gcgggtgggc at gggaaagt gctcca tctg cattacgcag    1020
gaagtgtctg cctgtgggc g gccccaagca ac agcagtgt acaagg tgtc agagtatgca    1080
cggcgctttg gtgttcctg c cattgctgat gg aggaatcc aaaatg tggg tcatattgcg    1140
aaagccttgg ccttggggc ctccacagtc at gatgggct ctctcc tggc tgccaccact    1200
gaggcccttg gtgaatact t cttttccgat gg gatccggc taaga aata tcgctgtatg    1260
ggttctctcg atgcatgga caagcacctc ag cagccaga acagat attt cagtgaagct    1320
gacaaatca aagtggccc a gggagtgtcc gg tgcgtg c aggaca aagg gtcaatccac    1380
aaatttctcc ctacctga t tgcctggcatc ca acactcat gccagg acat tggtgccaag    1440
agcttgaccc aagtcgagc catgatgtac tc tggggagc ttaagt ttga gaagagaacg    1500
tcctcagccc aggtggaag g tggcgccat ag cctccatt cgtatg agaa gcggcttttc    1560
tga

```

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 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
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 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 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		

FIGURA 14

```

atgcatcacc atcaccatca cgcgactac ctgattagt ggggcacgtc ctacgtgcc 60
gacgacggac tcacagcaca gcagctcttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac 120
tttctcattc tccctgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgct 180
ctgaccaaga aaatcactct taagaccca ctggtttcct ctcccatgga cacagtcaca 240
gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acagggcgta ttggcttcat ccaccacaac 300
tgtacacctg aattccaggc caatgaagtt cggaaagtga agaaatatga acagggattc 360
atcacagacc ctgtggtcct cagccccaag gatcgctgc gggatgttt tgaggccaag 420
gcccggcatg gtttctgcgg tatcccaatc acagacacag gccggatggg gagccgcttg 480
gtgggcatca tctcctccga agacattgat tttctcgagg aggaggaaca tgactgttcc 540
ttggaagaga taatgacaaa gagggaagac ttggtggtag cccctgcagg catcacactg 600
aaggaggcaa atgaaattct gcagcgagc aagaaggga agttgcccat tgtaaataa 660
gatgatgagc ttgtggccat cattgcccgg acagacctga agaagaatcg ggactacca 720
ctagcctcca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtggg cagccattgg cactcatgag 780
gatgacaagt ataggctgga cttgctcgcc caggctggg tggatgtagt ggttttggac 840
tcttcccagg gaaattccat ctccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac 900
cctaattctc aagtcattgg aggcaatgtg gtcactgctg cccaggccaa gaacctcatt 960
gatgcaggtg tggatgccct gcgggtgggc atgggaagtg gctccatctg cattacgcag 1020
gaagtgctgg cctgtgggcg gcccgaagca acagcagtgt acaagggtgc agagtatgca 1080
cggcgctttg gtgtccggg cattgctgat ggaggaatcc aaaatgtggg tcatattgag 1140
aaagccttgg cccttggggc ctccacagtc atgatgggct ctctcctggc tgccaccact 1200
gaggccccct gtgaatactt cttttccgat gggatccggc taaagaaata tcgcggtatg 1260
ggttctctcg atgccatgga caagcacctc agcagccaga acagatattt cagtgaagct 1320
gacaaaatca aagtggccca gggagtgtct ggtgctgtgc aggacaaagg gtcaatccac 1380
aaatttgtcc cttacctgat tgetggcatc caacactcat gccaggacat tggtgccaag 1440
agcttgaccc aagtccgagc catgatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg 1500
tcctcagccc aggtggaagg tggcgccat agcctccatt cgtatgagaa gcggcttttc 1560
tga 1563

```

FIGURA 15A

Met	His	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	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	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 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

```


FIGURA 16

atgcctcacc atcaccatca cgcgcactac ctgattagtg ggggcacgtc ctacgtgcc	60
gacgacggac tcacagcaca gcagctcttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac	120
tttctcattc tccctgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgct	180
ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctgggtttcct ctcccatgga cacagtcaca	240
gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acaggcggtg ttggcttcat ccaccacaac	300
tgtacacctg aattccaggc caatgaagtt cggaaagtga agaaatatga acagggattc	360
atcacagacc ctgtggctct cagccccgaa gatgaggtgg aagatgtttt tgaggccgaa	420
gccgagcatg gtttctgcgg tatcccaatc acagacacag gcgaaatggg aagcgagttg	480
gtgggcatca tctcctccag ggacattgat tttctcaaag aggaggaaca tgactgtttc	540
ttggaagaga taatgacaaa gagggaagac ttgggtggtg cccctgcagg catcacactg	600
aaggaggcaa atgaaattct gcagcgcagc aagaaggga agttgccccat tgtaaataaa	660
gatgatgagc ttgtggccat cattgcccgg acagacctga agaagaatcg ggactaccca	720
ctagcctcca aagatgcca gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag	780
gatgacaagt ataggctgga ctgtctcgcc caggctgggtg tggatgtagt ggttttggac	840
tcttcccagg gaaattccat cttccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac	900
cctaattctc aagtcattgg aggcaatgtg gtcaactgctg cccaggccaa gaacctcatt	960
gatgcagggtg tggatgcctt gcgggtgggc atgggaagtg gctccatctg cattacgcag	1020
gaagtgtctg cctgtgggctg gcccgaagca acagcagtggt acaagggtgc agagtatgca	1080
cggcgctttg gtgttccggt cattgtctgat ggaggaaatc aaaatgtggg tcatattgctg	1140
aaagccttgg cccttggggc ctccacagtc atgatgggct ctctcctggc tgccaccact	1200
gaggccctg gtgaatactt cttttccgat gggatccggc taaagaaata tcgcggtatg	1260
ggttctctcg atgccatgga caagcacctc agcagccaga acagatattt cagtgaagct	1320
gacaaaaatc aagtggccca gggagtgtct ggtgctgtgc aggacaaagg gtcaatccac	1380
aaatttctcc cttacctgat tgctggcatc caacactcat gccaggacat tgggtccaag	1440
agcttgaccc aagtcaggc catgatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg	1500
tcctcagccc aggtggaagg tggcgtccat agcctccatt cgtatgagaa gcggcttttc	1560
tga	1563

FIGURA 17A

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	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	

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

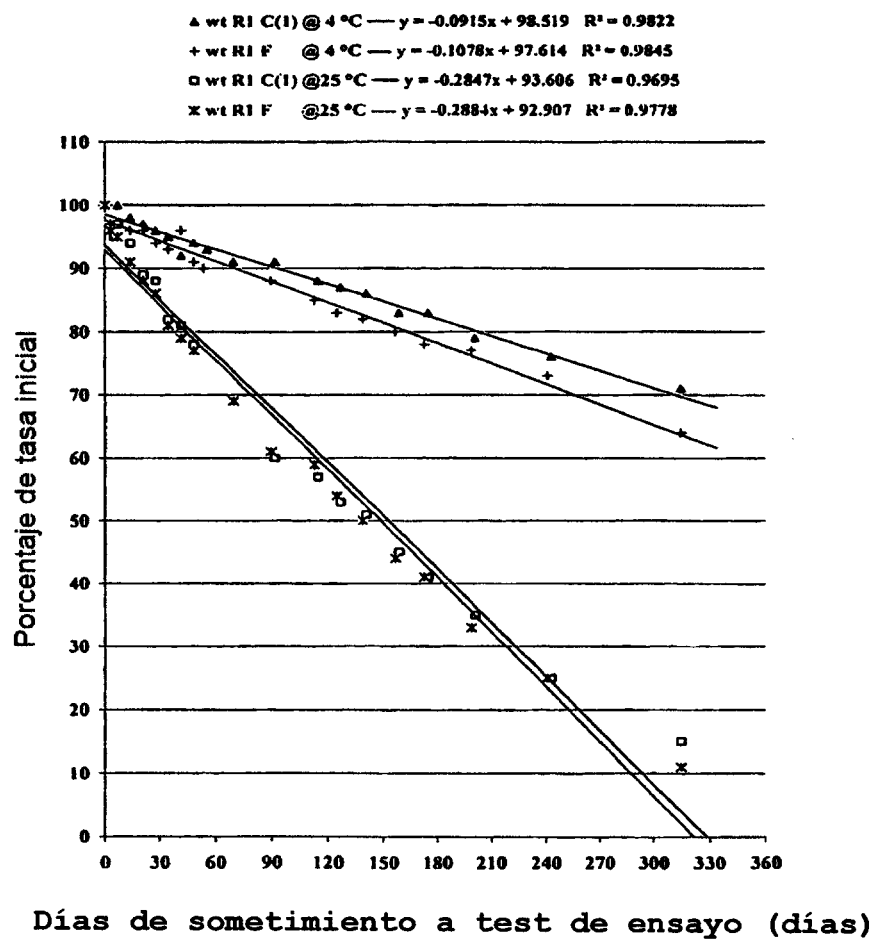


FIGURA 19

Tasa de estabilidad de R1 ampliada (wt + AH)

R2 = NP40

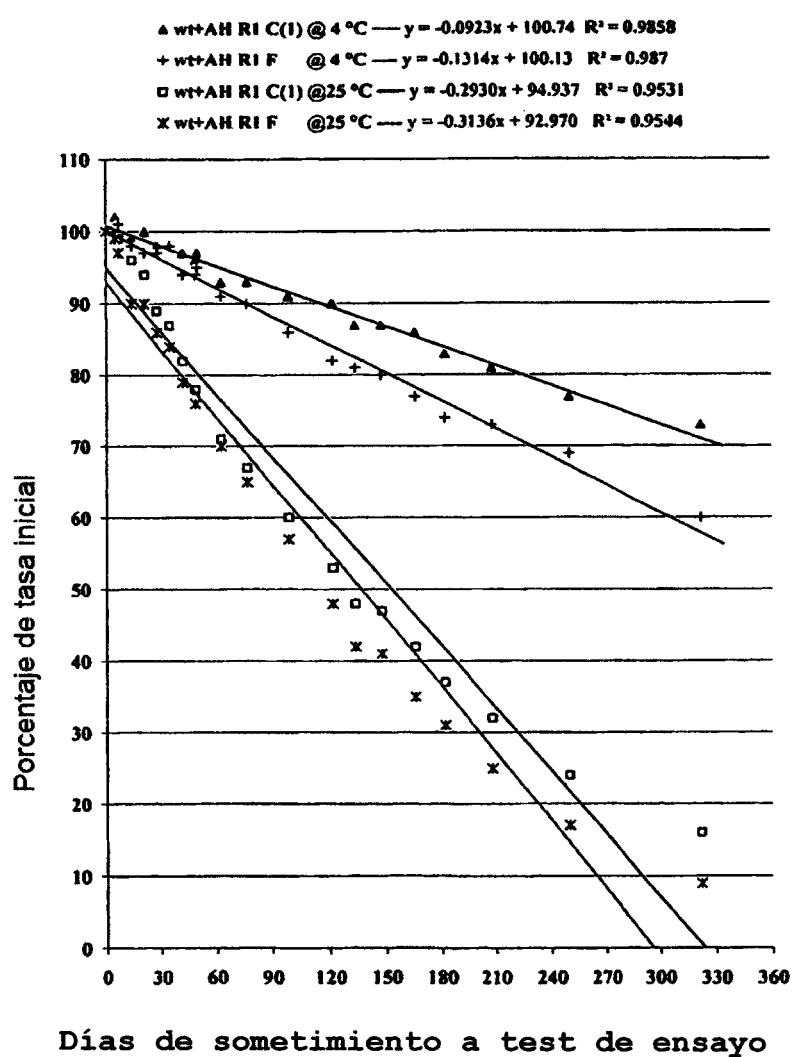
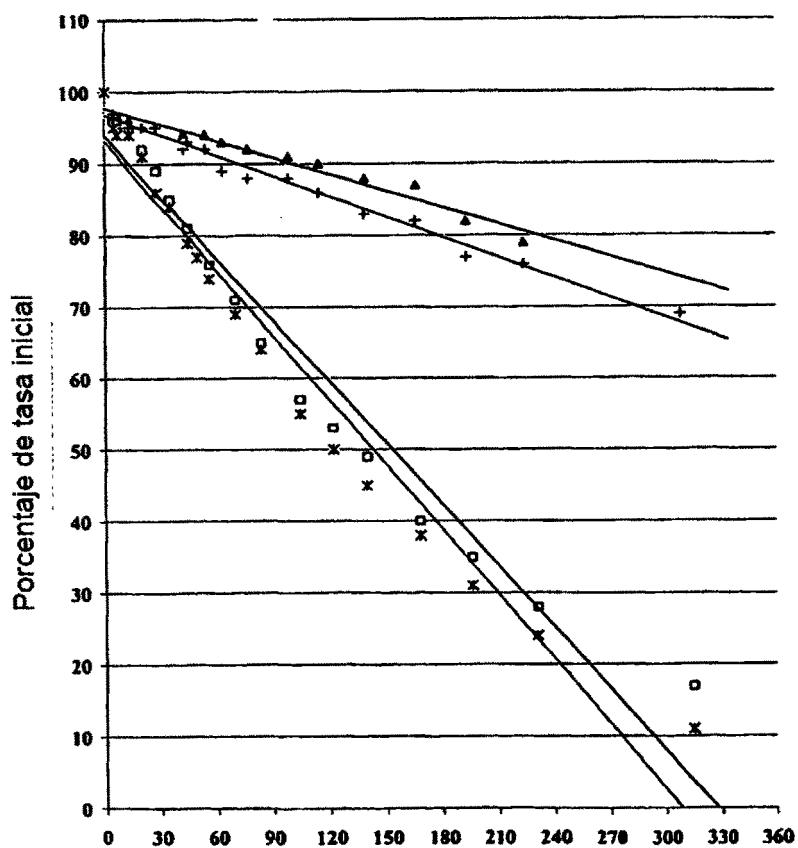


FIGURA 20

Tasa de estabilidad de R1 ampliada

(Δ2B + AH clon A) R2 = NP40

▲ D2B+AH Clon A R1 C(1) @ 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(1) @ 25 °C — $y = -0.2864x + 93.951$ $R^2 = 0.9591$
 x D2B+AH Clon A R1 F @ 25 °C — $y = -0.3018x + 93.211$ $R^2 = 0.9645$



Días de sometimiento a test de ensayo (días)

FIGURA 21

Tasa de estabilidad de R1 ampliada

((Δ 3 + 1) + AH clon A) R2 = NP40

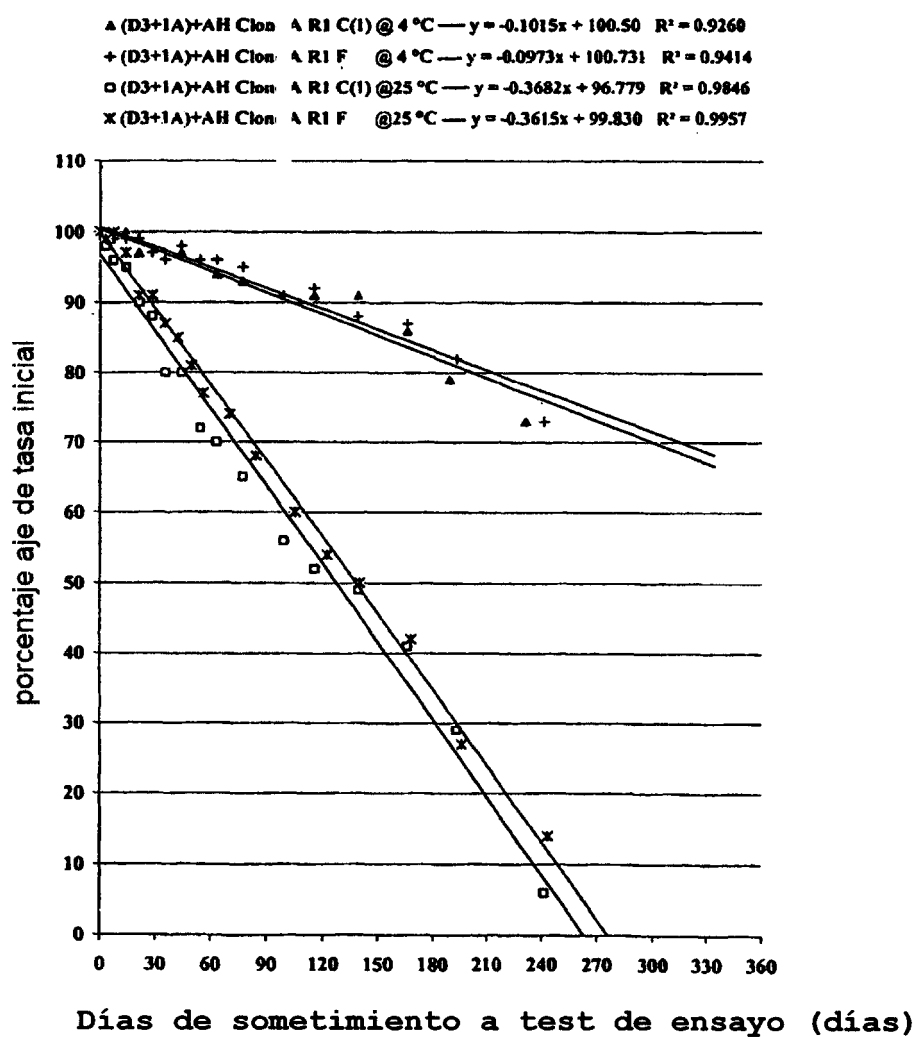


FIGURA 22

Tasa de estabilidad de R1 ampliada

(Δ 1,2A + AH clon B) R2 = NP40

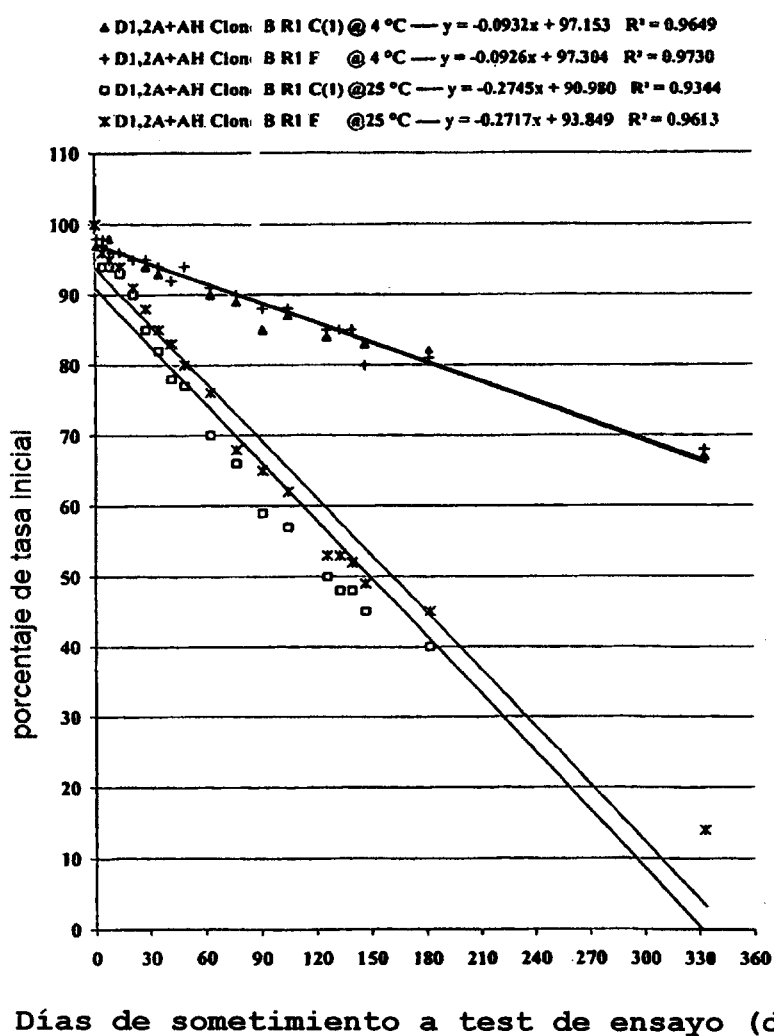


FIGURA 23

Tasa de estabilidad de R1 ampliada

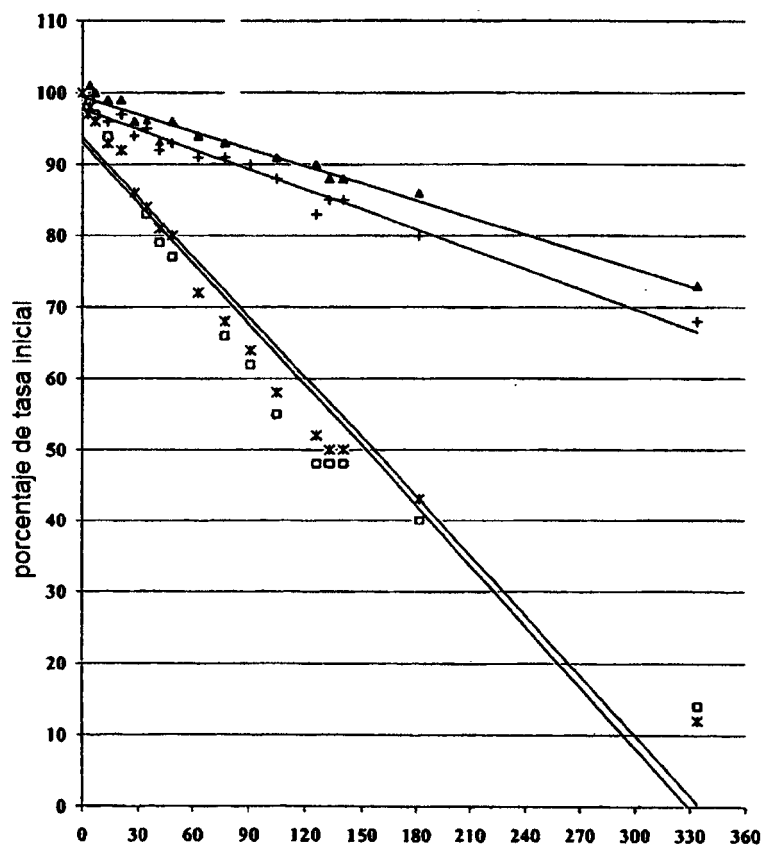
(Δ 3B + AH clon B) R2 = NP40

Δ D3B+AH Clon B R1 C(1) @ 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(1) @ 25 °C — $y = -0.2834x + 93.158$ $R^2 = 0.9270$

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

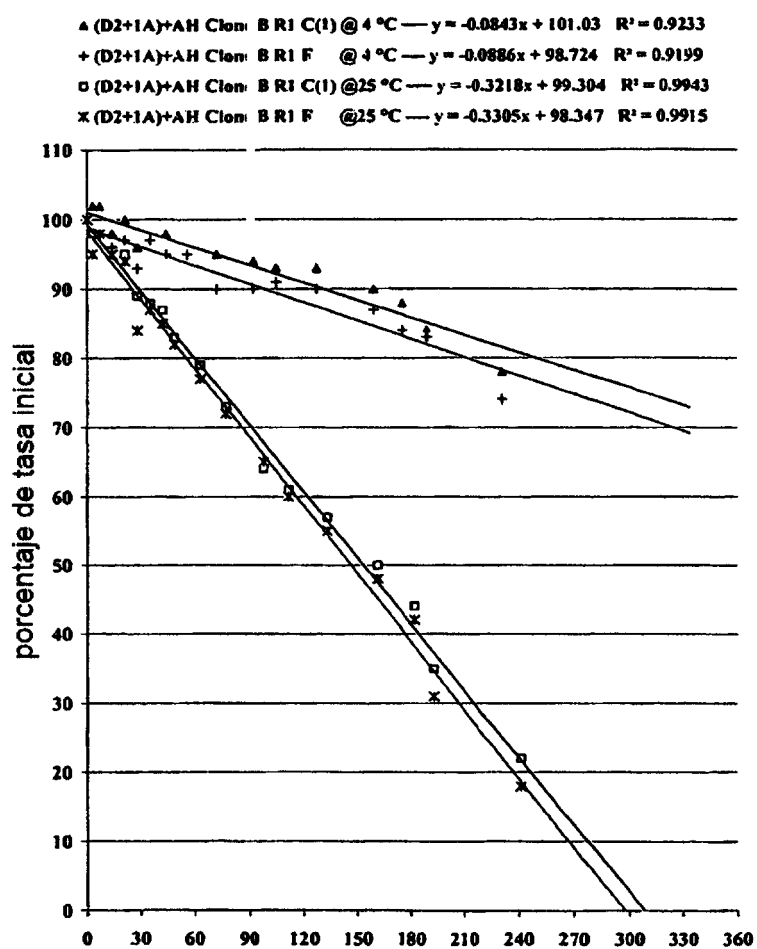


Días de sometimiento a test de ensayo (días)

FIGURA 24

Tasa de estabilidad de R1 ampliada

(Δ 1,2A + AH clon B) R2 = NP40



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> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
25	ggagatatac atatgcatca ccatcacat cacgccgact acc	43
	<210> 2	
	<211> 43	
30	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 2	
35	ggtagtcggc gtgatggtga tggtagtca tatgtatatc tcc	43
	<210> 3	
40	<211> 64	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 3	
	ggtcctcagc cccgaagatg aggtggaaga tgtttttgag gccgaagccg agcatgggtt	60
50	ctgc	64
	<210> 4	
55	<211> 64	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 4	
	gcagaaacca tgctcggctt cggcctcaaa aacatcttcc acctcatctt cggggctgag	60
65	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	accaactcg ctccccattt cgctgtgtc tgtgattgg	39
	<210> 7	
25	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 7	
	ggcatcatct cctccgaaga cattgatttt ctgaggagg aggaac	46
35	<210> 8	
	<211> 46	
	<212> DNA	
40	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8	
45	gttcctctc ctcgagaaaa tcaatgtctt cggaggagat gatgcc	46
	<210> 9	
	<211> 1545	
	<212> DNA	
50	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
55	<221> inicio de transcripción (características misceláneas)	
	<222> (350)..(555)	
	<223> subdominio	
60	<400> 9	
	atggcgcgact acctgattag tgggggcacg tcctacgtgc cagacgacgg actcacagca	60
	cagcagctct tcaactgcgg agacggcctc acctacaatg acttttctcat tctccctggg	120
65	tacatcgact tcactgcaga ccaggtggac ctgacttctg ctctgaccaa gaaaatcact	180
	cttaagaccc cactggtttc ctctcccatg gacacagtea cagaggctgg gatggccata	240

ES 2 322 477 T3

gcaatggcgc ttacaggcgg tattggcttc atccaccaca actgtacacc tgaattccag 300
 gccaatgaag ttcggaaagt gaagaaatat gaacagggat tcatcacaga ccctgtggtc 360
 5 ctcagcccca aggatcgcgt gcgggatgtt tttgaggcca aggcccggca tggtttctgc 420
 ggtatcccaa tcacagacac aggccggatg gggagccgct tggtagggcat catctcctcc 480
 10 agggacattg attttctcaa agaggaggaa catgactgtt tcttggaga gataatgaca 540
 aagaggggaag acttgggtgt agcccctgca ggcacacac tgaaggaggc aaatgaaatt 600
 ctgcagcgca gcaagaaggg aaagtgtccc attgtaaatg aagatgatga gcttgtggcc 660
 15 atcattgtccc ggacagacct gaagaagaat cgggactacc cactagcctc caaagatgcc 720
 aagaaacagc tgctgtgtgg ggcagccatt ggcactcatg aggatgacaa gtataggctg 780
 gacttgctcg ccaggctgg tgtggatgta gtggttttgg actcttccca gggaaattcc 840
 20 atcttccaga tcaatatgat caagtacatc aaagacaaat accctaattc ccaagtcatt 900
 ggaggcaatg tggtcactgc tgcccaggcc aagaacctca ttgatgcagg tgtggatgcc 960
 ctgcgggtgg gcatgggaag tggctccatc tgcattacgc aggaagtgtt ggcctgtggg 1020
 25 cggccccaag caacagcagt gtacaagggtg tcagagtatg cacggcgctt tgggtgttccg 1080
 gtcattgctg atggaggaat ccaaaatgtg ggtcatattg cgaaagcctt ggcccttggg 1140
 30 gcctccacag tcatgatggg ctctctcctg gctgccacca ctgaggcccc tggatgaatac 1200
 ttcttttccg atgggatccg gctaaagaaa tatcgcggtg tgggttctct cgatgccatg 1260
 gacaagcacc tcagcagcca gaacagatat ttcagtgaag ctgacaaaat caaagtggcc 1320
 35 caggaggtgt ctgggtgctg gcaggacaaa gggatcaatc acaaatttgt cccttacctg 1380
 attgctggca tccaacactc atgccaggac attggtgcca agagcttgac ccaagtccga 1440
 40 gccatgatgt actctgggga gcttaagttt gagaagagaa cgtcctcagc ccagggtgaa 1500
 ggtggcgtcc atagcctcca ttcgtatgag aagcggtttt tctga 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	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		

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

<210> 11
 30 <211> 1563
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*
 35 <220>
 <221> mutación
 <222> (4)..(21)
 40 <223> inserción
 <220>
 <221> INICIO DE TRANSCRIPCIÓN (CARACTERÍSTICAS MISCELANEAS)
 45 <222> (350)..(555)
 <223> subdominio
 <400> 11

atgcatcacc atcaccatca cgccgactac ctgattagtg ggggcacgtc ctacgtgcc 60
 55 gacgacggac tcacagcaca gcagctcttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac 120
 tttctcattc tccctgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gaattctgct 180
 ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctgggtttct ctcccatgga cacagtcaca 240

ES 2 322 477 T3

gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acagggcgta ttggcttcat ccaccacaac 300
 tgtacacctg aattccaggc caatgaagtt cggaaagtga agaaatatga acagggattc 360
 5 atcacagacc ctgtggteet cagccccaag gatcgcggtg gggatgtttt tgaggccaag 420
 gcccgscatg gtttctgcgg tatcccaatc acagacacag gccggatggg gagccgcttg 480
 gtgggcatca tctctccag ggacattgat tttctcaaag aggaggaaca tgactgtttc 540
 10 ttggaagaga taatgacaaa gagggagac ttggtaggtg cccctgcagg catcacactg 600
 aaggaggcaa atgaaattct gcagcgagc aagaaggga agttgccat tgtaaatgaa 660
 gatgatgagc ttgtggccat cattgcccg acagacctga agaagaatcg ggactacca 720
 15 ctgacctca aagatgcca gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag 780
 gatgacaagt ataggctgga cttgctcgcc caggctggtg tggatgtagt ggttttgagc 840
 tcttccagg gaaattccat cttccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac 900
 20 cctaactctc aagtcattgg aggcaatgtg gtcactgctg cccaggccaa gaacctcatt 960
 gatgcagggtg tggatgccct gcgggtgggc atgggaagtg gctccatctg cattacacag 1020
 gaagtgttg cctgtggggt gccccaagca acagcagtgt acaagggtgc agagtatgca 1080
 25 cggcgctttg gtgttcgggt cattgctgat ggaggaatcc aaaatgtggg tcatattgctg 1140
 aaagccttg cccttggggc ctccacagtc atgatgggt ctctcctggc tgccaccact 1200
 gaggeccctg gtgaatactt cttttccgat gggatccggc taaagaaata tcgcggtatg 1260
 30 ggttctctcg atgccatgga caagcacctc agcagccaga acagatattt cagtgaagct 1320
 gacaaaaatc aagtggccca gggagtgtct ggtgtgtgc aggacaaagg gtcaatccac 1380
 aaatttgtcc cttacctgat tgctggcatc caacactcat gccaggacat tggtgccaag 1440
 35 agcttgaccc aagtcagag catgatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg 1500
 tcctcagccc aggtggaagg tggcgccat agcctccatt cgtatgagaa gcggcttttc 1560
 40 tga 1563

<210> 12

45 <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 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

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

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

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

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

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

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
 Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile
 305 310 315 320
 30
 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
 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
 45
 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
 Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe
 485 490 495
 20
 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> *Homo sapiens*
 <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 gcagctcttc aactgccggag acggcctcac ctacaatgac 120
 ttctctcattc tccctgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgct 180
 60 ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctggtttcct ctcccatgga cacagtcaca 240

65

ES 2 322 477 T3

gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acaggcggtg ttggttcat ccaccacaac 300
 tgtacacctg aattccaggc caatgaagtt cggaaagtga agaaatatga acagggattc 360
 5 atcacagacc ctgtggctct cagccccaag gatcgcgctg gggatgtttt tgaggccaag 420
 gcccgcatg gtttctgcgg tatcccaatc acagacacag gcgaaatggg aagcgagttg 480
 gtgggcatca tctcctccag ggacattgat tttctcaaag aggaggaaca tgactgtttc 540
 10 ttggaagaga taatgacaaa gaggggaagac ttggtggtag cccctgcagg catcacactg 600
 aaggaggcaa atgaaattct gcagcgagc agaagggaag agttgcccat tgtaaatgaa 660
 gatgatgagc ttgtggccat cattgcccgg acagacctga agaagaatcg ggactacca 720
 15 ctacgtcca aagatgcaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag 780
 gatgacaagt ataggctgga ctgtctgcc caggctggtg tggatgtagt ggttttggac 840
 tcttcccagg gaaattccat ctccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatc 900
 20 cctaattctc aagtcattgg aggcaatgtg gtcactgctg cccaggcaa gaacctcatt 960
 gatgcaggtg tggatgccct gcgggtgggc atgggaagtg gctccatctg cattacgcag 1020
 gaagtgtctg cctgtgggcg gcccgaagca acagcagtg acaagggtgc agagtatgca 1080
 25 cggcgctttg gtgttccggt cattgtctgat ggaggaatcc aaaatgtggg tcatattgcg 1140
 aaagccttg cccttggggc ctccacagtc atgatgggt ctctcctggc tgccaccact 1200
 gagggccctg gtgaatactt cttttccgat gggatccggc taaagaaata tcgcggtatg 1260
 30 ggttctctcg atgccatgga caagcacctc agcagccaga acagatatct cagtgaagct 1320
 gacaaaatca aagtggccca gggagtgtct ggtgctgtgc aggacaaagg gtcaatccac 1380
 aaatttgtcc cttacctgat tgctggcatc caacactcat gccaggacat tggtgccaag 1440
 35 agcttgacct aagtcggagc catgatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg 1500
 tcctcagccc aggtggaagg tggcgccat agcctccatt cgtatgagaa gcggcttttc 1560
 tga 1563

40

<210> 14

<211> 520

45

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

<222> (2)..(7)

<223> his tag

55

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

<222> (155)..(155)

<223> mutación

60

<220>

<221> INICIO DE TRANSCRIPCIÓN (CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS)

<222> (159)..(159)

65

ES 2 322 477 T3

<223> mutación

<400> 14

5

Met His 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

20

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

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 Glu Met Gly Ser Glu Leu

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 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
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
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

ES 2 322 477 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

 50 His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe
 515 520

 55 <210> 15
 <211> 1563
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

 60 <220>
 <221> mutación
 <222> (4)..(21)
 <223> inserción

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

ES 2 322 477 T3

<400> 15

5	atgcatcacc atcaccatca cgccgactac ctgattagtg ggggcacgtc ctacgtgcc	60
	gacgacggac tcacagcaca gcagctcttc aactgcgag acggcctcac ctacaatgac	120
	tttctcattc tccctgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgct	180
10	ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctggtttcct ctcccatgga cacagtcaca	240
	gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acaggcggtta ttggcttcat ccaccacaac	300
	tgtacacctg aattccaggc caatgaagtt cggaaagtga agaaatatga acagggattc	360
15	atcacagacc ctgtggtcct cagccccaag gatcgctgc gggatgtttt tgaggccaag	420
	gcccgcatg gtttctcgcg tatcccaatc acagacacag gccggatggg gagccgcttg	480
	gtgggcatca tctcctccga agacattgat tttctcgagg aggaggaaca tgactgtttc	540
20	ttggaagaga taatgacaaa gaggaagac ttggtggtag cccctgcagg catcacactg	600
	aaggaggcaa atgaaattct gcagcgcagc aagaaggga agttgcccat tgtaaatgaa	660
	gatgatgagc ttgtggccat cattgcccg acagacctga agaagaatcg ggactacca	720
25	ctagcctcca aagatgccaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag	780
	gatgacaagt ataggctgga cttgctcgcc caggtctggt tggatgtagt ggttttggac	840
	tcttcccagg gaaattccat cttccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac	900
30	cctaattctc aagtcattgg aggcaatgtg gtcactgctg cccaggccaa gaacctcatt	960
	gatgcaggtg tggatgccct gcgggtgggc atgggaagtg gctccatctg cattacgcag	1020
	gaagtgtctg cctgtggcg gcaccaagca acagcagtg acaagggtgc agagtatgca	1080
35	cggcgctttg gtgttcgggt cattgctgat ggaggaatcc aaaatgtggg acatattgcg	1140
	aaagccttgg cccttggggc ctccacagac atgatgggt ctctcctggc tgccaccact	1200
	gagggccctg gtgaatactt cttttccgat gggatccggc taaagaaata tcgcggtatg	1260
40	ggttctctcg atgcatgga caagcacctc agcagccaga acagatattt cagtgaagct	1320
	gacaaaatca aagtggccca gggagtgtct ggtgctgtgc aggacaaagg gtcaatccac	1380
	aaatttgtcc cttacctgat tgctggcatc caacactcat gccaggacat tggtgccaag	1440
45	agcttgaccc aagtcagagc catgatgtac, tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg	1500
50	tcctcagccc aggtggaagg tggcgccat agcctccatt cgtatgagaa gcggcttttc	1560
	tga	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	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
	Glu	Ala	Gly	Met	Ala	Ile	Ala	Met	Ala	Leu	Thr	Gly	Gly	Ile	Gly	Phe	85	90	95	
40	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 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
 35
 Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile
 245 250 255
 40
 Gly Thr His Glu Asp Asp Lys Tyr Arg Leu Asp Leu Leu Ala Gln Ala
 260 265 270
 45
 Gly Val Asp Val Val Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe
 275 280 285
 50
 Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr Ile Lys Asp Lys Tyr Pro Asn Leu Gln
 290 295 300
 55
 Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile
 305 310 315 320
 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
 Leu Gly Ala Ser Thr Asp Met Met Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Thr
 385 390 395 400
 20 Glu Ala Pro Gly Glu Tyr Phe Phe Ser Asp Gly Ile Arg Leu Lys Lys
 405 410 415
 25 Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser
 420 425 430
 30 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
 35 Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Gln His Ser Cys Gln Asp Ile Gly Ala Lys
 465 470 475 480
 40 Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe
 485 490 495
 45 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

- 50 <210> 17
 <211> 1563
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*
 55 <220>
 <221> mutación
 <222> (4)..(21)
 60 <223> inserción
 <220>
 <221> características misceláneas (inicio de transcripción)
 65 <222> (350)..(555)
 <223> subdominio

ES 2 322 477 T3

<400> 17

	atgcatcacc atcaccatca cgccgactac ctgattagtg ggggcacgtc ctacgtgcca	60
	gacgacggac tcacagcaca gcagctcttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac	120
5	ttttctcattc tccctgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgct	180
	ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctggtttcct ctcccatgga cacagtcaca	240
	gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acaggcggta ttggcttcat ccaccacaac	300
10	tgtacacctg aattccaggc caatgaagtt cggaagtga agaaatatga acagggattc	360
	atcacagacc ctgtggctct cagccccaag gatcgctg gcggatgttt tgaggccgaa	420
	gccgagcatg gttcttgcgg tatcccaatc acagacacag gccggatggg gagccgcttg	480
15	gtgggcatca tctcctccag ggacattgat tttctcaaag aggaggaaca tgactgtttc	540
	ttggaagaga taatgacaaa gagggaagac ttggtggtag cccctgcagg catcacactg	600
	aaggaggcaa atgaaattct gcagcgagc aagaaggga agttgcccat tgtaatgaa	660
20	gatgatgagc ttgtggccat cattgcccgg acagacctga agaagaatcg ggactaccca	720
	ctagctcca aagatgcaa gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag	780
	gatgacaagt ataggctgga cttgctcgcc caggctggg tggtatgagt ggttttgac	840
25	tcttcccagg gaaattccat cttccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac	900
	cctaattctc aagtcattgg aggcaatgtg gtcactgctg cccaggccaa gaacctcatt	960
	gatgcaggtg tggatgccct gcgggtgggc atgggaagtg gctccatctg cattacgcag	1020
30	gaagtgtctg cctgtgggag gcccgaagca acagcagtg acaagggtgc agagtatgca	1080
	cggcgctttg gtgttccggt cattgctgat ggaggaatcc aaaatgtggg tcatattgag	1140
	aaagccttgg cccttggggc ctccacagtc atgatgggct ctctcctggc tgccaccact	1200
35	gaggcccttg gtgaatactt cttttccgat gggatccggc taaagaaata tcgcggtatg	1260
	ggttctctcg atgccatgga caagcacctc agcagccaga acagatatct cagtgaagct	1320
	gacaaaatca aagtggccca gggagtgtct ggtgctgtgc aggacaaagg gtcaatccac	1380
40	aaatttgtcc cttacctgat tgctggcatc caacactcat gccaggacat tggtgccaag	1440
	agcttgacc aagtccgagc catgatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg	1500
	tcctcagccc aggtggaagg tggcgtccat agcctccatt cgtatgagaa gcggcttttc	1560
45	tga	1563

<210> 18

<211> 520

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

<222> (2). (7)

<223> his tag

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

<222> (140)..(140)

<223> mutación

<220>

ES 2 322 477 T3

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

<222> (142)..(142)

<223> mutación

5

<400> 18

10

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

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

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 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

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

45

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

50

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

55

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

60

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 Val Leu Asp Ser Ser Gln Gly Asn Ser Ile Phe

ES 2 322 477 T3

	275	280	285
5	Gln Ile Asn Met Ile Lys Tyr 290	Ile Lys Asp Lys Tyr 295	Pro Asn Leu Gln 300
	Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile 305	310	315 320
10	Asp Ala Gly Val Asp Ala Leu Arg Val Gly Met Gly Ser Gly Ser Ile 325	330	335
15	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
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
	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
	Val Ser Gly Ala Val Gln Asp Lys Gly Ser Ile His Lys Phe Val Pro 450	455	460
40	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
45	Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu 500	505	510
50	His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe 515	520	

<210> 19

<211> 1563

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> mutación

<222> (4)..(21)

<223> inserción

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)

ES 2 322 477 T3

<222> (350)..(555)

<223> subdominio

5 <400> 19

atgcatcacc	atcaccatca	cgccgactac	ctgattatgt	ggggcacgtc	ctacgtgcc	60
gacgacggac	tcacagcaca	gcagctcttc	aactgcggag	acggcctcac	ctacaatgac	120
tttctcattc	tccctgggta	catcgacttc	actgcagacc	aggtggacct	gacttctgct	180
ctgaccaaga	aaatcactct	taagacccca	ctggtttcct	ctcccatgga	cacagtcaca	240
gaggctggga	tggccatagc	aatggcgctt	acaggcggta	ttggcttcat	ccaccacaac	300
tgtacacctg	aattccaggc	caatgaagtt	cggaaagtga	agaaatatga	acagggattc	360
atcacagacc	ctgtggtcct	cagccccaag	gatcgcgtgc	gggatgtttt	tgaggccaag	420
gcccggcatg	gtttctgcgg	tatcccaatc	acagacacag	gccggatggg	gagccgcttg	480
gtgggcatca	tctcctccga	agacattgat	tttctcgagg	aggaggaaca	tgactgtttc	540
ttggaagaga	taatgacaaa	gagggaagac	ttggtggtag	cccctgcagg	catcacactg	600
aaggaggcaa	atgaaattct	gcagcgcagc	aagaagggaa	agttgcccat	tgtaaatgaa	660
gatgatgagc	ttgtggccat	cattgcccg	acagacctga	agaagaatcg	ggactacca	720
ctagcctcca	aagatgccaa	gaaacagctg	ctgtgtgggg	cagccattgg	cactcatgag	780
gatgacaagt	ataggctgga	cttgctcgcc	caggctgggt	tggatgtagt	ggttttggac	840
tcttcccagg	gaaattccat	cttccagatc	aatatgatca	agtacatcaa	agacaaatac	900
cctaattctc	aagtcattgg	aggcaatgtg	gtcactgctg	cccaggccaa	gaacctcatt	960
gatgcaggtg	tggatgccct	gcgggtgggc	atgggaagtg	gtcccatctg	cattacgcag	1020
gaagtgtctg	cctgtggg	gccccaaagca	acagcagtgt	acaagggtgc	agagtatgca	1080
cgcgctttg	gtgttccggt	cattgctgat	ggaggaatcc	aaaaatgtggg	tcatattg	1140
aaagccttgg	cccttggggc	ctccacagtc	atgatgggct	ctctcctggc	tgccaccact	1200
gaggccccctg	gtgaatactt	cttttccgat	gggatccggc	ttaaagaaata	tcgcggtatg	1260
ggttctctcg	atgccatgga	caagcacctc	agcagccaga	acagatat	cagtgaagct	1320
gacaaaatca	aagtggccca	gggagtgtct	ggtgctgtgc	aggacaaagg	gtcaatccac	1380
aaatttgtcc	cttacctgat	tgtgtggcatc	caacactcat	gccaggacat	tgttgccaag	1440
agcttgaccc	aagtcggagc	catgatgtac	tctggggagc	ttaagtttga	gaagagaacg	1500
tcctcagccc	aggtggaagg	tggcgctccat	agcctccatt	cgatgagaa	gcggcttttc	1560
tga						1563

55 $\langle 210 \rangle$ 20

<211> 520

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60
 $\langle 220 \rangle$

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (IINICO DE TRANSCRIPCIÓN)

$\langle 222 \rangle$ (2)..(7)

65 <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 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

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

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

35 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

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

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

50 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 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

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

65 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
 Val Ile Gly Gly Asn Val Val Thr Ala Ala Gln Ala Lys Asn Leu Ile
 305 310 315 320
 20
 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
 Val Tyr Lys Val Ser Glu Tyr Ala Arg Arg Phe Gly Val Pro Val Ile
 355 360 365
 30
 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

<220>

15 <221> características misceláneas (inicio de transcripción)

<222> (350)..(555)

<223> subdominio

20

<400> 21

25	atgcacaccc atcaccatca cgccgactac ctgattagtg ggggcacgtc ctacgtgcca	60
	gacgacggac tcacagcaca gcagctcttc aactgcggag acggcctcac ctacaatgac	120
	tttctcattc tccctgggta catcgacttc actgcagacc aggtggacct gacttctgct	180
	ctgaccaaga aaatcactct taagacccca ctgggtttcct ctcccatgga cacagtcaca	240
30	gaggctggga tggccatagc aatggcgctt acaggcggta ttggcttcat ccaccacaac	300
	tgtacacctg aattccaggc caatgaagtt cggaaagtga agaaatatga acagggattc	360
	atcacagacc ctgtgtgctc cagcccccga gatgaggttg aagatgtttt tgaggccgaa	420
35	gccgagcatg gtttctgcgg tateccaatc acagacacag gcgaaatggg aagcgagttg	480
	gtgggcatca tctcctccag ggacattgat tttctcaaag aggaggaaca tgactgtttc	540
	ttggaagaga taatgacaaa gagggaagac ttggtggtag cccctgcagg catcacactg	600
40	aaggaggcaa atgaaattct gcagcgcagc aagaaggga agttgcccatt tgtaaatgaa	660
	gatgatgagc ttgtggccat cattgcccgg acagacctga agaagaatcg ggactaccca	720
	ctagcctcca aagatgcca gaaacagctg ctgtgtgggg cagccattgg cactcatgag	780
45	gatgacaagt ataggctgga cttgctcgcc caggctggtg tggatgtagt ggttttggac	840
	tcttcccagg gaaattccat ctccagatc aatatgatca agtacatcaa agacaaatac	900
	cctaattctc aagtcatttg aggcaatgtg gtcactgctg cccaggccaa gaacctcatt	960
50	gatgcaggtg tggatgccct gcgggtgggc atgggaagtg gctccatctg cattacgeag	1020
	gaagtgtctg cctgtgggcg gcccgaagca acagcagtg acaagggtgc agagtatgca	1080
	cggcgctttg gtgttccggt cattgctgat ggaggaatcc aaaatgtggg tcatattgag	1140
55	aaagccttgg cccttggggc ctccacagtc atgatgggct ctctcctggc tgccaccact	1200
	gaggcccttg gtgaatactt cttttccgat gggatccggc taaagaaata tcgcggtatg	1260
	ggttctctcg atgcatgga caagcacctc agcagccaga acagatatct cagtgaagct	1320
60	gacaaaatca aagtggccca gggagtgtct ggtgctgtgc aggacaaagg gtcaatccac	1380
	aaatttgtcc cttacctgat tgctggcatc caacactcat gccaggacat tggtgccaag	1440
	agcttgaccc aagtccgagc catgatgtac tctggggagc ttaagtttga gaagagaacg	1500
65	tcttcagccc aggtggaagg tggcgctccat agcctccatt cgtatgagaa gcggcttttc	1560
	tga	1563

ES 2 322 477 T3

<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>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)
 25 <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>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS (INICIO DE TRANSCRIPCIÓN)
 45 <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

 65

ES 2 322 477 T3

<400> 22

5	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
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
	Glu Ala Gly Met Ala Ile Ala Met Ala Leu Thr Gly Gly Ile Gly Phe	85 90 95
25	Ile His His Asn Cys Thr Pro Glu Phe Gln Ala Asn Glu Val Arg Lys	100 105 110
30	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
35	Phe Cys Gly Ile Pro Ile Thr Asp Thr Gly Glu Met Gly Ser Glu Leu	145 150 155 160
40	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
45	Val Ala Pro Ala Gly Ile Thr Leu Lys Glu Ala Asn Glu Ile Leu Gln	195 200 205
50	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
55	Leu Ala Ser Lys Asp Ala Lys Lys Gln Leu Leu Cys Gly Ala Ala Ile	245 250 255
60	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
65	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
 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 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
 25
 Tyr Arg Gly Met Gly Ser Leu Asp Ala Met Asp Lys His Leu Ser Ser
 420 425 430
 30
 Gln Asn Arg Tyr Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ile Lys Val Ala Gln Gly
 435 440 445
 35
 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
 40
 Ser Leu Thr Gln Val Arg Ala Met Met Tyr Ser Gly Glu Leu Lys Phe
 485 490 495
 45
 Glu Lys Arg Thr Ser Ser Ala Gln Val Glu Gly Gly Val His Ser Leu
 500 505 510
 50
 His Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Phe
 515 520