



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 291**

51 Int. Cl.:
C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04749338 .2**

96 Fecha de presentación : **05.03.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1603511**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.12.2005**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades por deposición de IgA1.**

30 Prioridad: **07.03.2003 US 453055 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.06.2011

73 Titular/es:
New England Medical Center Hospitals, Inc.
750 Washington Street
Boston, Massachusetts 02111, US

72 Inventor/es: **Plaut, Andrew, G. y**
Qiu, Jiazhou

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 360 291 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades por deposición de IgA1

5 **Apoyo gubernamental**

La invención fue financiada, en parte o en su totalidad, mediante una subvención NIH RO1 DE 09677 de NIH, NIDCR. El gobierno estadounidense tiene determinados derechos sobre la invención.

10 **Antecedentes**

15 La deposición de inmunoglobulina A1 (IgA1) en tejidos y órganos humanos es una característica de muchas enfermedades humanas incluyendo la neuropatía por IgA, la dermatitis herpetiforme (DH) y la púrpura de Henoch-Schoenlein (HS). La deposición de IgA1 es responsable de una variedad de manifestaciones clínicas tales como insuficiencia renal, formación de ampollas cutáneas, exantema, artritis, hemorragia gastrointestinal y dolor abdominal.

20 Existen varias opciones de tratamiento disponibles para pacientes que presentan deposición anómala de IgA1. Éstas incluyen la administración de corticosteroides que presentan propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias, aportes complementarios de aceite de pescado en la dieta que reducen la inflamación renal, e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina que reducen el riesgo de enfermedad renal progresiva e insuficiencia renal. Dichos tratamientos no actúan directamente sobre los depósitos de IgA1 en tejido u órganos.

25 Para tratar este problema de la eliminación de depósitos de IgA1, se han sometido a prueba enzimas proteolíticas exógenas en modelos animales de deposición de IgA1 (Gesualdo L. *et al*, (1990) J. Clin. Invest. 86: 715-722 y Nakazawa M. *et al*. (1986) J. Exp. Med 164: 1973-1987). Las proteasas, quimopapaína y subtilisina, actúan mediante escisión proteolítica de los depósitos de IgA1 en el riñón, pero no son específicas para las moléculas de IgA1 y digerirán una variedad de otras proteínas.

30 Así, pese a los avances en el campo, existe una necesidad en la materia de agentes terapéuticos que puedan utilizarse para tratar las enfermedades por deposición de IgA1.

Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona una IgA1 proteasa para su utilización en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la deposición de IgA1 en un paciente. En la presente memoria se da a conocer la utilización de IgA1 proteasa bacteriana para tratar la deposición de IgA1 en tejido y órganos. Las IgA1 proteasas bacterianas escinden específicamente las moléculas de IgA1 y proporcionan así un medio para escindir y eliminar específicamente las deposiciones de IgA1. Por consiguiente, se dan a conocer agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades caracterizada por la deposición de IgA. En particular, se dan a conocer agentes terapéuticos para tratar la nefropatía por IgA, dermatitis herpetiforme (DH) y púrpura de Henoch-Schoenlein (HS).

45 En la presente memoria se da a conocer una molécula de ácido nucleico que codifica para una IgA1 proteasa que se fusiona a un marcador de aminoácido ubicado en sentido amino-terminal de un sitio de escisión autocatalítica de la IgA1 proteasa.

50 En un aspecto, el marcador, que se fusiona a las IgA1 proteasas, es un marcador que se une específicamente a un ligando de proteína, tal como un anticuerpo o péptido. El marcador puede ser c-Myc, HA, VSV-G, HSV, FLAG, V5, o HIS.

En un aspecto, se da a conocer una composición farmacéutica para el tratamiento de la deposición de IgA1 que comprende una IgA1 proteasa complejada con un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-IgA1 proteasa.

55 En otro aspecto, se da a conocer una composición farmacéutica para el tratamiento de la deposición de IgA1 que comprende una IgA1 proteasa marcada que está complejada con un ligando del marcador. El marcador fusionado a la IgA1 proteasa puede ser c-Myc, HA, VSV-G, HSV, FLAG, V5 o HIS. Por consiguiente, el ligando puede ser un anticuerpo antimarcador, tal como anti-FLAG, antimYC, anti-VSV, anti-HA o anti-V5. Alternativamente, el ligando puede ser un péptido o un ligando no peptídico, tal como una molécula quelante.

60 En otro aspecto, se da a conocer un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la deposición de IgA1. El procedimiento implica administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una IgA1 proteasa.

65 En un aspecto, el procedimiento para el tratamiento utiliza una IgA1 proteasa fusionada a un marcador complejada con un ligando del marcador, tal como un anticuerpo antimarcador. El marcador fusionado a la IgA1 proteasa puede ser c-Myc, Flag, HA, VSV-G, HSV, FLAG, V5 o HIS. Por lo tanto, el anticuerpo antimarcador puede ser anti-FLAG,

antimYC, anti-VSV, anti-HA o anti-V5.

En otro aspecto, la enfermedad caracterizada por la deposición de IgA1 es nefropatía por IgA, dermatitis herpetiforme o púrpura de Henoch-Schoenlein.

5

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la región bisagra de IgA1 y los sitios de escisión para varias IgA1 proteasas dentro de la región bisagra (SEC ID n°: 1).

10

La figura 2a ilustra el precursor de IgA1 proteasa que se somete a escisión autocatalítica y libera una IgA1 proteasa madura soluble mediante la escisión autocatalítica.

15

La figura 2b representa una IgA1 proteasa en la que se ha fusionado una cola de His a la IgA1 proteasa de manera que la cola de His está dispuesta próxima al extremo carboxilo terminal de la IgA1 proteasa madura. La IgA1 proteasa soluble puede complejarse entonces con un anticuerpo anti-His para fines terapéuticos.

20

La figura 3 representa una representación esquemática de la proteína precursora de IgA1 proteasa de *Haemophilus influenzae* Rd y representa una secuencia de aminoácidos que está en sentido amino-terminal del sitio de escisión autocatalítica (sitio a), secuencia original (SEC ID n°: 2). La secuencia mutada (SEC ID n°: 3) representa dónde se ha fusionado una cola de His en marco a una IgA1 proteasa, 2 aminoácidos en sentido amino-terminal del sitio de escisión proteolítica. También se representan las secuencias de ácido nucleico correspondientes de la secuencia original (SEC ID n°: 25) y la secuencia mutada (SEC ID n°: 26).

25

La figura 4 representa los fragmentos de mutagénesis dirigida al sitio por PCR que se generaron para la inserción de una cola de HIS en la IgA1 proteasa de *H. influenzae* Rd mediante técnicas de ligamiento convencionales.

La figura 5 representa la secuencia de proteína de *Haemophilus influenzae* Rd (SEC ID n°: 4).

30

La figura 6 representa la secuencia de nucleótido de *Haemophilus influenzae* Rd (SEC ID n°: 5).

Descripción detallada

35

La presente invención se refiere a la utilización de inmunoglobulina A1 proteasas (IgA1 proteasas) bacterianas para tratar enfermedades que están caracterizadas por la deposición de IgA1.

Definiciones

40

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "IgA1 proteasa" se refiere a una enzima bacteriana que escinde específicamente moléculas de IgA1 humana. Mediante "escinde específicamente" se hace referencia a que la proteasa escinde en la región bisagra de moléculas de IgA1 humana y no escinde moléculas de IgA2 humana. Las IgA1 proteasas se expresan en bacterias Gram negativas y Gram positivas como un precursor monocatenario que atraviesa la membrana bacteriana. Las IgA1 proteasas de las bacterias Gram negativas se someten a escisión autocatalítica liberando una IgA1 proteasa madura soluble del extremo N-terminal.

45

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "ubicado en sentido amino-terminal" se refiere al parámetro espacial de un marcador en el que la secuencia de aminoácidos del marcador está ubicada por lo menos 2 aminoácidos, o 1, o ninguno, en sentido amino-terminal con respecto a, y hasta 50 aminoácidos en sentido amino-terminal con respecto a, el sitio de escisión autocatalítica de la IgA1 proteasa de manera que el marcador está ubicado de 2 ó 1, o ninguno, a 50 aminoácidos en sentido amino-terminal del extremo carboxilo-terminal de la IgA1 proteasa secretada, soluble.

50

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "marcador" se refiere a una secuencia de polipéptido de 3 a 40 aminoácidos de longitud. Un marcador puede poseer una afinidad de unión específica por un péptido, ligando de proteína, o un ligando no peptídico. La afinidad de unión específica permite que la IgA1 proteasa a la que se fusiona se compleje con un ligando con el fin de que la IgA1 proteasa pueda detectarse, aislarse, aumentarse en una forma compleja, o utilizarse para fines terapéuticos. En la presente memoria, un marcador también comprende un marcador fluorescente, un marcador luminescente o un marcador cromogénico. Los ejemplos no limitativos de marcadores incluyen c-Myc, HA, y VSV-G, HSV, FLAG, V5 y HIS.

55

Mediante "complejada con un ligando" se hace referencia a que la IgA1 proteasa se une específicamente a una pareja de unión, tal como un anticuerpo, o molécula quelante. La pareja de unión específica puede estar unida a una matriz, tal como una perla. La expresión "se une específicamente" se refiere a la interacción de dos moléculas, por ejemplo, un anticuerpo o una proteína o péptido o un agente quelante, en la que la interacción depende de la presencia de estructuras particulares en las moléculas respectivas. Por ejemplo, cuando las dos moléculas son moléculas de proteína, una estructura en la primera molécula reconoce y se une a una estructura en la segunda

60

65

molécula, en lugar de proteínas en general. “Unión específica”, tal como se utiliza la expresión en la presente memoria, significa que una molécula se une a su pareja de unión específica con por lo menos una afinidad dos veces mayor, y preferentemente por lo menos una afinidad 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o superior de lo que se une a una molécula no específica.

Mediante “detectado” se hace referencia a una manera de determinar la presencia o ausencia del marcador, tal como “detección” mediante inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpo monoclonal antimarcador, detección mediante inmunofluorescencia, o detección debida a que el propio marcador flúorese. Los ejemplos no limitativos de marcadores adecuados incluyen c-Myc, Flag, HA, y VSV-G, HSV, FLAG, V5 y HIS.

Mediante “aislada” se hace referencia a que la IgA1 proteasa se separa de los materiales celulares bacterianos, tal como la membrana celular o cualquier proteína o ácido nucleico presente en los medios de crecimiento bacteriano. Los ejemplos de procedimientos no limitativos de aislamiento incluyen el aislamiento de una IgA1 proteasa que presenta una cola de poli-histidinas utilizando perlas o una resina de quelato de metal, inmunoprecipitación, y purificación en columna de afinidad utilizando anticuerpos antimarcador.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina, o fragmento de la misma, que puede unirse a un antígeno, tal como un marcador o IgA1 proteasa. Se pretende que el término “anticuerpo” incluya anticuerpos completos, por ejemplo, de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgB, etc.), y que incluya fragmentos de los mismos que también son específicamente reactivos con una proteína de vertebrado, por ejemplo, de mamífero. Los anticuerpos pueden fragmentarse utilizando técnicas convencionales. Así, el término incluye segmentos de partes escindidas proteolíticamente o preparadas de manera recombinante de una molécula de anticuerpo que pueden reaccionar selectivamente con una proteína determinada. Los ejemplos no limitativos de tales fragmentos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, dAc y anticuerpos de cadena sencilla (scFv) que contienen un dominio V_L y V_H unido mediante un ligador peptídico. Los scFv pueden unirse covalente o no covalentemente para formar anticuerpos que presentan dos o más sitios de unión. Así, los anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, u otras preparaciones purificadas de anticuerpos y anticuerpos recombinantes. En la presente memoria, la expresión “anticuerpo antimarcador” se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un marcador.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “deposición de IgA1” se refiere a la acumulación de inmunoglobulina IgA1 en forma agregada o no agregada en tejido u órganos humanos.

En la presente memoria, una “enfermedad caracterizada por la deposición de IgA1” se refiere a cualquier enfermedad en la que se produce deposición de IgA1, tal como, pero sin limitarse a nefropatía por IgA, dermatitis herpetiforme y púrpura de Henoch-Schoenlein.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “nefropatía por IgA” se refiere a una enfermedad renal caracterizada por depósitos de IgA1 dentro del riñón.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “dermatitis herpetiforme” se refiere a una enfermedad de formación de ampollas crónica asociada con depósitos de IgA1 en la piel y otros tejidos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “púrpura de Henoch-Schoenlein” se refiere a una enfermedad cutánea y renal caracterizada por deposición de IgA1 en tejido cutáneo y tejido renal.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una “composición farmacéutica” comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un principio activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente memoria, “cantidad farmacológicamente eficaz,” o simplemente “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de un agente eficaz para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo deseado. Por ejemplo, si un tratamiento clínico dado se considera eficaz cuando se produce por lo menos una reducción del 25% en un parámetro medible asociado con una enfermedad o trastorno.

I. IgA1 proteasas

En la presente memoria, se utilizan IgA1 proteasas para tratar enfermedades caracterizadas por la deposición de IgA1. Las IgA1 proteasas son enzimas bacterianas que escinden específicamente moléculas de IgA1 humana. La IgA2 humana es resistente a casi todas las IgA1 proteasas conocidas porque las moléculas de IgA2 carecen de una región bisagra que está presente en todas las moléculas de IgA1. La región bisagra de las moléculas de IgA1 consiste en una hebra de aminoácidos, que contiene sitios de escisión para una variedad de IgA1 proteasas, tal como se ilustra en la figura 1. Las IgA1 proteasas se expresan en bacterias Gram negativas como un precursor monocatenario que atraviesa la membrana interna de la bacteria. La proteína precursora se inserta entonces por sí misma en la membrana externa bacteriana y se somete a escisión autocatalítica, liberando una IgA1 proteasa madura soluble (figura 2a). Las IgA proteasas de las bacterias Gram positivas también son útiles en esta invención, aunque no presentan un mecanismo de secreción autocatalítico. Para tales proteasas, se añade un marcador de epítipo en la proteína enzimática.

En un aspecto, una secuencia de marcador se fusiona en marco a una IgA1 proteasa, de manera que la secuencia de marcador esté ubicada próxima al extremo carboxilo-terminal de la IgA1 proteasa secretada (figura 2b). La figura 3 muestra una representación esquemática de la proteína precursora de IgA1 proteasa de *Haemophilus influenzae* Rd que ilustra que una secuencia de marcador (por ejemplo, cola de His) se fusiona en marco a una IgA1 proteasa en sentido amino-terminal de los sitios de escisión autocatalítica a, b y c.

Una variedad de bacterias producen IgA1 proteasa y son útiles en la presente invención. Éstas comprenden de manera no limitativa *Haemophilus influenzae* de tipo 1 y 2, *Neisseria meningitidis* de tipo 1 y 2, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguis*, *Clostridium ramosum*, *Prevotella melaninogenica* y *Ureaplasma urealyticum*,

Las secuencias de nucleótidos de la IgA1 proteasa pueden obtenerse a partir de cualquier bacteria en la que se exprese una IgA1 proteasa, siempre que la IgA1 proteasa pueda escindir moléculas de IgA1 humana. Ya se han identificado las secuencias de nucleótidos que codifican para IgA1 proteasas de numerosas cepas bacterianas e incluyen: *Clostridium ramosum* (registro de Genbank, AY028440); *Ureaplasma urealyticum* (registro de Genbank, NC_002162); *Haemophilus influenzae* (registro de Genbank, X59800) y cepas bacterianas Rd (registro de Genbank, NC-000907), 7768 (registro de Genbank, AF274862), 6338 (registro de Genbank, AF27486), 2509 (registro de Genbank, AF274859), *aegyptius* (registro de Genbank, AF369907), 8625 (registro de Genbank, AJ001741), HE284 (registro de Genbank, X82487), Da66 (registro de Genbank, X82467), HK635 (registro de Genbank, X82488), y otras secuencias depositadas de cepas no identificadas (números de registro de Genbank, X59800, X82488, X64357, M87492, M87491, M87490, y M87489); *Neisseria meningitidis* (número de registro de Genbank AF235032) y cepas bacterianas, Z2491 (registro de Genbank, NC-03316), B40 (registro de Genbank, AF012211), Z4099 (registro de Genbank, AF012210), Z4018 (registro de Genbank, AF012209), Z4400 (registro de Genbank, AF012208), Z3524 (registro de Genbank, AF012207), Z4024 (registro de Genbank, AF012206), Z3910 (registro de Genbank, AF012205), Z3906 (registro de Genbank, AF012204), Z2491 (registro de Genbank, AF012203), IHN341 (registro de Genbank, AJ001740), NL3327 (registro de Genbank, AJ001739), NL823 (registro de Genbank, AJ001737), NL3293 (registro de Genbank, AJ001738), HK284 (registro de Genbank, X82487), ETH2 (registro de Genbank, X82469), NGO93 (registro de Genbank, X82482), NCG80 (registro de Genbank, X82479), NG117 (registro de Genbank, X82483), HF96 (registro de Genbank, X82475), HF54 (registro de Genbank, X82473), HF48 (registro de Genbank, X82480), HF13 (registro de Genbank, X82474), NGC65 (registro de Genbank, X82484), NCG16 (registro de Genbank, X82485), SM1894 (registro de Genbank, X82476), EN3771 (registro de Genbank, X82468), NG44/76 (registro de Genbank, X82481), SM1166 (registro de Genbank, X82486), HF159 (registro de Genbank, X82471), 81139 (registro de Genbank, X82477), HF117 (registro de Genbank, X82470), SM1027 (registro de Genbank, X82472) y número de registro de Genbank, AF235032; *Neisseria gonorrhoeae* (número de registro de Genbank, A12416) y cepa bacteriana MS11 (registro de Genbank, S75490); *Streptococcus pneumoniae* (número de registro de Genbank, X94909) y cepas bacterianas MGAS315 (registro de Genbank, NC-004070), R6 (registro de Genbank, NC-003098); y *Streptococcus sanguis* (registro de Genbank, NC-003098) y cepas bacterianas SK85 (registro de Genbank, Y13461), SK49 (registro de Genbank, Y13460), SK4 (registro de Genbank, Y13459), SK162 (registro de Genbank, Y13458), SK161 (registro de Genbank, Y13457), SK115 (registro de Genbank, Y13456, y Sk112 (registro de Genbank, Y13455).

Construcción de vectores

Las secuencias que codifican para IgA1 proteasas pueden clonarse en vectores adecuados para la expresión de la proteína, de manera que puede producirse y aislarse la IgA1 proteasa soluble. Los vectores pueden construirse utilizando procedimientos convencionales (Sambrook *et al.*, Molecular Biology: A laboratory Approach, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989; Ausubel, *et al.*, Current protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, 1995), guiados por los principios tratados más adelante: en resumen, se usan técnicas de ligamiento convencionales para insertar secuencias de ADN que codifican para IgA1 proteasa en vectores bacterianos de clonación y/o expresión.

Para preparar ácidos nucleicos que codifican para IgA1 proteasa, se requiere una fuente de genes que codifican para IgA1 proteasas. Los genes pueden obtenerse de fuentes naturales o sintéticas. Los procedimientos para clonar genes de IgA1 proteasa novedosos de cepas bacterianas se describen en Lomholt H., *et al.*, Mol. Microbiol. (1995) 15(3), 495-508; Fishman, Y. *et al.*, (1985), págs. 164-168 en G. K. Schoolink (ed.), The Pathogenic Neisseria, Am. Soc. Microbiol., Washington DC; Koomey, J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1982) 79: 7881-7885; Halter, R, *et al.*, EMBO J., (1984) 3:1595-1601; Bricker, J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1983), 80:2681-2685; Koomey, J. M. y Falkow, S., citado anteriormente; Grundy, J. F. *et al.*, J. Bacteriol., (1987) 169:4442-4450; y Gilbert, J.V. *et al.*, Infect. Immun., (1988) 56:1961-1966.

Alternativamente, puede aislarse ADN que codifica para una IgA1 proteasa conocida de ADN genómico bacteriano mediante amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos para el gen de IgA1 de interés. En resumen, el ADN genómico bacteriano se aísla utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo utilizando kits de aislamiento de ADN genómico bacteriano proporcionados por QIAGEN o procedimientos convencionales descritos en Sambrook *et al.*, Molecular Biology: A laboratory Approach, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel, *et al.*, Current protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, (1995).

La PCR es bien conocida en la técnica (Mullis y Faloona, *Methods Enzymol.*, (1987), 155: 335. En general, los cebadores de oligonucleótido son moléculas de ADN o ARN monocatenarias que se hibridan selectivamente con un molde de ácido nucleico que codifica para IgA1 proteasa para cebar la síntesis enzimática de una segunda cadena de ácido nucleico. El cebador es complementario a una parte de una molécula diana presente en un conjunto de moléculas de ácido nucleico del genoma bacteriano. Se contempla que los cebadores se preparen mediante procedimientos sintéticos, o bien químicos o bien enzimáticos. Alternativamente, una molécula de este tipo o fragmento de la misma se produce de manera natural y se aísla de su fuente natural o se adquiere de un proveedor comercial. Los cebadores de oligonucleótido mutagénicos tienen de 15 a 100 nucleótidos de longitud, idealmente desde 20 hasta 40 nucleótidos, aunque pueden utilizarse oligonucleótidos de diferente longitud. Preferentemente, los cebadores también comprenden una secuencia de enzima de restricción única.

Normalmente, la hibridación enzimática se produce cuando dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente complementarias (por lo menos complementarias en aproximadamente el 65% en un tramo de por lo menos 14 a 25 nucleótidos, preferentemente por lo menos en aproximadamente el 75%, más preferentemente por lo menos complementarias en aproximadamente el 90%). Véase Kanehisa, *Nucleic Acids Res.*, (1984), 12:203.

Como resultado, se espera que se tolere un cierto grado de apareamiento erróneo en el sitio de cebado. Un apareamiento erróneo de este tipo puede ser pequeño, tal como un mono, di o trinucleótido. Alternativamente, puede comprender bucles de nucleótidos, que se definen como regiones en las que el apareamiento erróneo engloba una serie ininterrumpida de cuatro o más nucleótidos.

En general, cinco factores influyen en la eficacia y la selectividad de la hibridación del cebador con una segunda molécula de ácido nucleico. Estos factores que son (i) la longitud del cebador, (ii) la composición y/o la secuencia de nucleótidos, (iii) la temperatura de hibridación, (iv) la composición química del tampón y (v) la posibilidad de impedimento estérico en la región en la que se requiere que hibride el cebador, son consideraciones importantes cuando se diseñan secuencias de cebado no aleatorio.

Existe una correlación positiva entre la longitud del cebador y tanto la eficacia como la exactitud con la que se apareará un cebador con una secuencia diana: las secuencias más largas presentan una temperatura de fusión (TM) superior que las más cortas, y es menos probable que se repitan dentro de una secuencia diana dada, minimizándose de este modo la hibridación imprecisa. Las secuencias de cebador con un alto contenido en G-C o que comprenden secuencias palindrómicas tienden a hibridarse consigo mismas, como lo hacen sus sitios diana previstos, puesto que la cinética de hibridación unimolecular, en lugar de la bimolecular, está favorecida generalmente en disolución: al mismo tiempo, es importante diseñar un cebador que contenga números suficientes de emparejamientos de nucleótidos G-C para unirse estrechamente a la secuencia diana, puesto que cada uno de tales pares se une mediante tres puentes de hidrógeno, en lugar de los dos que se encuentran cuando hay pares de bases de A y T. La temperatura de hibridación varía inversamente con la eficacia de apareamiento del cebador, al igual que la concentración de disolventes orgánicos, por ejemplo formamida, que podría incluirse en una mezcla de hibridación, mientras que los aumentos en la concentración salina facilitan la unión. En condiciones de hibridación rigurosas, las sondas más largas se hibridan de manera más eficaz que las más cortas, que son suficientes en condiciones más permisivas. Las condiciones de hibridación rigurosas normalmente incluyen concentraciones salinas inferiores a aproximadamente 1 M, más normalmente inferiores a aproximadamente 500 mM y preferentemente inferiores a aproximadamente 200 mM. Las temperaturas de hibridación oscilan desde tan solo 0°C hasta más de 22°C, más de aproximadamente 30°C, y (con menos frecuencia) superiores a aproximadamente 37°C. Los fragmentos más largos pueden requerir temperaturas de hibridación superiores para la hibridación específica. Puesto que varios factores afectan a la rigurosidad de la hibridación, la combinación de parámetros es más importante que la medición absoluta de cualquiera de ellas sola.

Los cebadores se diseñan preferentemente utilizando programas informáticos que ayudan en la generación y optimización de secuencias de cebador. Los ejemplos de dichos programas son "PrimerSelect" del paquete de software DNASTar™ (DNASTar, Inc.; Madison, WI) y OLIGO 4.0 (National Biosciences, Inc.). Una vez diseñado, se preparan oligonucleótidos adecuados mediante un procedimiento adecuado, por ejemplo el procedimiento de fosforamida descrito por Beaucage y Carruthers (1981) *Tetrahedron Lett.*, 22: 1859) o el procedimiento de triéster según Matteucci y Caruthers (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, 103:3185, o mediante otros procedimientos químicos utilizando cualquier sintetizador de oligonucleótidos automatizado comercial de tecnología VLSIPS™.

La PCR se realiza utilizando ADN bacteriano de molde (por lo menos 1 fg: más normalmente, 1-1000 ng) y por lo menos 25 pmol de cebadores de oligonucleótido; puede ser ventajoso utilizar una cantidad mayor de cebador cuando el conjunto de cebadores es muy heterogéneo, ya que cada secuencia está representada sólo por una pequeña fracción de las moléculas del conjunto, y las cantidades resultan limitativas en los últimos ciclos de amplificación. Una mezcla de reacción típica incluye: 2 µl de ADN, 25 pmol de cebador de oligonucleótido, 2,5 µl de 10X tampón de PCR 1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 0,4 µ de dNTP 1,25 mM, 0,15 µl (o 2,5 unidades) de Taq ADN polimerasa (Perkin Elmer, Foster City, CA) y agua desionizada hasta un volumen total de 25 µl. Se recubre con aceite mineral y se realiza la PCR utilizando un ciclador térmico programable.

La duración y la temperatura de cada etapa de un ciclo de PCR, así como el número de ciclos, se ajustan según las necesidades de rigurosidad vigentes. La temperatura y el momento del apareamiento se determinan tanto mediante la eficacia con la que se espera que el cebador se aparee con un molde como mediante el grado de apareamiento erróneo que va a tolerarse; obviamente cuando se amplifican y mutagenizan simultáneamente moléculas de ácido nucleico, se requiere apareamiento erróneo, por lo menos en la primera ronda de síntesis. Se utiliza una temperatura de apareamiento de entre 30°C y 72°C. La desnaturalización inicial de las moléculas de molde se produce normalmente a entre 92°C y 99°C durante 4 minutos, seguido por 20-40 ciclos que consisten en desnaturalización (94-99°C durante de 15 segundos a 1 minuto), apareamiento (temperatura determinada tal como se trató anteriormente: 1-2 minutos), y extensión (72°C durante 1-5 minutos, dependiendo de la longitud del producto amplificado). La extensión final se realiza generalmente durante 4 minutos a 72°C, y puede ir seguida por una etapa indefinida (0-24 horas) a 4°C.

Tras la amplificación por PCR, el ADN puede aislarse mediante medios convencionales, tales como electroforesis en gel, o purificación en columna. El ADN que codifica para la IgA1 proteasa bacteriana puede digerirse con enzimas de restricción apropiadas y ligarse en un vector de clonación y/o expresión adecuado.

Vectores y células huésped

En la presente invención puede utilizarse cualquier vector. Tal como se utiliza en la presente memoria, vector se refiere a un elemento diferenciado que se utiliza para introducir ADN heterólogo en células bacterianas para la expresión y/o replicación del mismo. Numerosos vectores adecuados para la presente invención están disponibles para el público, incluyendo plásmidos bacterianos y bacteriófagos. Cada vector contiene diversos componentes funcionales, que generalmente incluyen un sitio de clonación (o "poliligador"), un origen de replicación y por lo menos un gen marcador seleccionable. Si el vector dado es un vector de expresión, posee adicionalmente uno o más de los siguientes: elemento potenciador, promotor, secuencias señal y de terminación de la transcripción, cada uno colocado en las proximidades del sitio de clonación, de manera que se unan operativamente al gene que codifica para una IgA1 proteasa según la invención.

Tanto los vectores de clonación como los de expresión generalmente contienen secuencias de ácido nucleico que permiten que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Normalmente en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias que se replican de manera autónoma. Tales secuencias se conocen bien para una variedad de bacterias. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas.

Ventajosamente, un vector de clonación o expresión puede contener un gen de selección denominado también un marcador seleccionable. Este gen codifica para una proteína necesaria para la supervivencia o el crecimiento de células huésped transformadas crecidas en un medio de cultivo selectivo. Por tanto, las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican para proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, complementan deficiencias autotróficas, o suministran nutrientes críticos no disponibles en los medios de crecimiento.

Puesto que la replicación de vectores se realiza de la manera más conveniente en *E. coli*, debe utilizarse un marcador seleccionable para *E. coli*, por ejemplo, el gen de β -lactamasa que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Éstos pueden obtenerse de plásmidos de *E. coli*, tales como pBR322 o un plásmido pUC tal como pUC18 o pUC19.

Los vectores de expresión normalmente contienen un promotor que se reconoce por el microorganismo huésped y que se une operativamente a la secuencia codificante de interés. Un promotor de este tipo puede ser inducible o constitutivo. La expresión "unida operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia control "unida operativamente" a una secuencia codificante se liga de una manera tal que se logre la expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con las secuencias control.

Promotores adecuados para su utilización con huéspedes procariotas incluyen, por ejemplo, los sistemas de promotor de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema de promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Los promotores para su utilización en sistemas bacterianos también contendrán generalmente una secuencia de Shine-Delgamo unida operativamente a la secuencia codificante. Promotores preferidos son los promotores regulables por isopropiltiogalactósido (IPTG).

Cualquier cepa bacteriana se considera una célula huésped adecuada para la expresión y la clonación de la IgA1 proteasas de la presente invención. Un huésped a modo de ejemplo es *E. coli*.

Introducción de vectores en células huésped.

Los vectores pueden introducirse en células huésped seleccionadas mediante cualquiera de varios procedimientos adecuados conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden introducirse constructos de vector en células bacterianas apropiadas mediante infección utilizando partículas de vector de bacteriófago tales como lambda o M13, o mediante cualquiera de varios procedimientos de transformación para vectores de plásmido o para ADN de bacteriófago. Por ejemplo, todavía se utiliza comúnmente transformación bacteriana mediada por cloruro de calcio convencional para introducir ADN desnudo en bacterias (Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), pero también puede utilizarse electroporación (Ausubel *et al.*, Current protocols in Molecular Biology, (1988), (John Wiley & Sons, Inc., NY, NY)).

Purificación de IgA1 proteasa soluble

Tras la introducción de un vector de expresión que codifica para la IgA1 proteasa en una célula bacteriana huésped adecuada, las bacterias se propagan para la producción en exceso de la IgA1 proteasa soluble mediante medios convencionales (Sambrook *et al.*, Molecular Biology. A laboratory Approach, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel, *et al.*, Current protocols in Molecular Biology, Greene Publishing (1995). En resumen, se hacen crecer bacterias, tales como *E. coli*, que albergan un vector de expresión que codifica para la IgA1 proteasa, o bacterias que tienen ADN que codifica para la IgA1 proteasa integrado en el genoma bacteriano, en medios de crecimiento bacteriano a 37°C. Cuando los cultivos bacterianos alcanzan la fase logarítmica, la IgA1 proteasa soluble se purifica de los medios de crecimiento mediante medios bien conocidos en la materia.

Por ejemplo, se cultivan bacterias *H. influenzae* Rd que expresan 6x His-IgA1 proteasa hasta 20 L (dos de 10L) en un fermentador cargado con caldo infusión cerebro-corazón complementado con NAD y hemina. Se hacen crecer las células a 37°C hasta que alcanzan la fase estacionaria, 16-20h. Entonces se elimina la masa bacteriana con un sistema Pellicon, y se concentra cada 10 L de sobrenadante de cultivo que contiene la enzima activa hasta 400 ml. Los tampones se ajustan para presentar la proteína en tampón Tris/HCl 25 mM, pH 7,5, con NaN₃ al 0,05%. Para eliminar la proteína no deseada, se aplican lotes de 80 ml de este concentrado a una columna de intercambio aniónico DE-52 con un volumen de lecho de 40 ml equilibrada en tampón Tris 25 mM. La IgA proteasa no se une a esta columna y se recoge como fracción no retenida utilizando 500 ml de tampón Tris. El rendimiento de la recuperación normalmente es del 85-90% basado en el ensayo que utiliza sustrato de IgA humana. Entonces se utiliza sulfato de amonio para precipitar la enzima (saturación del 60% de sulfato de amonio; 390 gm por l). El precipitado se disuelve con el siguiente tampón: fosfato de sodio 50 mM, Tris/HCl 12,5 mM, NaCl 0,3 M y azida de sodio al 0,025%, ajustado a 7,5, y entonces se dializa la enzima frente a este tampón durante varios días. El volumen final de disolución enzimática es de aproximadamente 200 ml por cada 10 l de cultivo inicial.

Para la purificación por afinidad, se aplican alícuotas de 40 ml de la disolución enzimática a Ni-NTA-agarosa en una columna con un volumen de lecho de 40 ml. La enzima unida se lava tres veces con volúmenes de 500 ml de tampones que contienen fosfato de sodio 50 mM, Tris/HCl 12,5 mM, NaCl 0,3 M y azida de sodio al 0,025%. El pH de estos lavados de tampón se reduce de forma progresiva, comenzando con pH 7,5, luego 6,6, luego 6,0, deseado para eliminar las proteínas débilmente adherentes, pero no las enzimáticas, del ligando de níquel. El lavado final utiliza de nuevo tampón a pH 7,5, ahora 200 ml. Entonces se eluye la 6x His-IgA proteasa de Ni-NTA agarosa utilizando 50 ml de imidazol 0,1 M en Tris/HCl 50 mM, pH 7,5. La enzima recuperada se concentra mediante filtración por presión positiva utilizando una membrana Centricon con punto de corte a 100 kDa, se lava tres veces con Hepes 25 mM, pH 7,15, y luego se almacena en tampón Hepes.

Ensayo para determinar la actividad de la IgA1 proteasa

La IgA1 proteasa se somete a prueba para determinar la actividad enzimática mediante unos medios convencionales tal como se describe en Plaut, AG y Bachovchin WW, IgA-specific prolyl endopeptidases: serine type. Methods Enzymol. 1994;244:137-51, que se incorpora a la presente memoria como referencia. El ensayo puede realizarse con proteasa purificada o IgA1 proteasa presente en medios de crecimiento bacteriano. Una IgA1 proteasa presenta actividad suficiente para ser útil según la invención si presenta una actividad de Unidad, siendo la Unidad igual a un microgramo de IgA1 humana escindida por minuto a 37°C.

II. IgA1 proteasa marcada

En una forma de realización, la IgA1 proteasa se fusiona a un marcador. La fusión de un marcador a las IgA1 proteasas de la presente invención ayuda en la purificación y detección de la proteasa, así como proporciona un medio en el que la IgA1 proteasa puede formar un complejo con un ligando, tal como un anticuerpo antimarcador, para fines terapéuticos.

Para generar una IgA proteasa que comprende un marcador, puede ligarse en marco una secuencia que codifica para un marcador a una secuencia que codifica para una IgA1 proteasa utilizando técnicas de biología molecular convencionales. La secuencia del marcador se liga en el sentido de 5' de la secuencia de ADN que codifica para el sitio de escisión autocatalítica de la IgA1 proteasa de manera que, con la escisión de la proteína precursora de IgA1

proteasa, se secreta una IgA1 proteasa soluble que comprende un marcador en unos medios de crecimiento bacteriano.

5 Alternativamente, se genera una IgA1 proteasa que comprende un marcador mediante mutagénesis dirigida al sitio basada en PCR. Existen varios procedimientos de mutagénesis dirigida al sitio conocidos en la materia que permiten mutar regiones específicas dentro de una proteína. Estos procedimientos se incorporan en varios kits comercializados para la realización de la mutagénesis dirigida al sitio, incluyendo procedimientos convencionales y basados en PCR. Los ejemplos incluyen el kit de mutagénesis dirigida al sitio basada en PCR EXSITE™ disponible de Stratagene (n.º de catálogo 200502; basado en PCR) y el kit de mutagénesis dirigida al sitio QUIKCHANGE™ de Stratagene (n.º de catálogo 200518; basado en PCR), y el kit de mutagénesis dirigida al sitio bicatenario CHAMELEON®, también de Stratagene (n.º de catálogo 200509). En resumen, se introduce una secuencia de marcador en un fragmento de PCR mediante la inclusión de una secuencia que codifica para el marcador cerca del extremo 5' o 3' de uno del cebador de PCR. Se genera el fragmento de PCR de manera que se proporcionan sitios de restricción apropiados, de modo que el fragmento puede digerirse y luego ligarse en el vector original para la sustitución de codones de aminoácidos específicos.

20 En una forma de realización, el marcador presenta una afinidad de unión específica por un anticuerpo, de modo que la proteasa forma un inmunocomplejo al unirse al ligando. Por ejemplo, el marcador puede comprender un epítipo único para el que se dispone fácilmente de anticuerpos. Alternativamente, el marcador puede comprender aminoácidos quelantes de metal (por ejemplo His) de modo que las IgA proteasas pueden complejarse con una perla o resina de quelante de metal, por ejemplo perlas de níquel-NTA.

25 En otra forma de realización, el marcador comprende un marcador detectable, tal como una enzima, o comprende un aminoácido que puede marcarse con un marcador detectable. Los marcadores detectables incluyen, por ejemplo, radioisótopos, moléculas fluorescentes, moléculas cromogénicas, moléculas luminiscentes y enzimas. Los marcadores detectables útiles incluyen biotina para teñir con conjugado de estreptavidina marcado, colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rojo Tejas, rodamina, proteína fluorescente verde, y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalinas y otros comúnmente utilizados en un ELISA), y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal. Las patentes que enseñan la utilización de tales marcadores detectables incluyen las patentes US n.ºs 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241, que se incorporan en su totalidad a la presente memoria como referencia.

35 Los ejemplos no limitativos de marcadores adecuados incluyen c-Myc, HA, y VSV-G, HSV, FLAG, V5 y HIS. A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos y ácido nucleico para cada marcador.

Marcador	Secuencias de péptido y ácido nucleico
HIS	Proteína: HHHHHH (SEC ID n.º: 6) ADN: CAC CAT CAC CAT CAC CAT (SEC ID n.º: 7)
c-Myc	Proteína: EQKLISEEDL (SEC ID n.º: 8) ADN: GAG CAA AAG CTC Art TCT GAA GAG GAC TTG (SEC ID n.º: 9)
HA	Proteína: YPYDVPDYA (SEC ID n.º: 10) ADN: TAC CCT TAT GAT GTG CCA GAT TAT GCC (SEC ID n.º: 11)
VSV-G	Proteína: YTDIEMNRLGK (SEC ID n.º: 12) ADN: TAT ACA GAC ATA GAG ATG AAC CGA CTT GGA AAG (SEC ID n.º: 13)
HSV	Proteína: QPELAPEDPED (SEC ID n.º: 14) ADN: CAG CCA GAA CTC GCC CCG GAA GAC CCC GAG GAT (SEC ID n.º: 15)
V5	Proteína: GKPIPNPLLGLDST (SEC ID n.º: 16) DNA: GGC AAA CCA ATC CCA AAC CCA CTG CTG GGC CTG GAT AGT ACT (SEQ ID NO:17)
FLAG	Proteína: DYKDDDDKG (SEC ID n.º: 18) ADN: GAT TAC AAA GAC GAT GAC GAT AAA GGA (SEC ID n.º: 19)

40 La colocación de un marcador en una IgA1 proteasa presenta el beneficio de que permite la fácil detección de la IgA1 proteasa tanto *in vivo* e *in vitro*. Un marcador que comprende un epítipo para un anticuerpo puede detectarse utilizando o bien anticuerpos antimarcador o bien anticuerpos que se conjugan con un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un aminoácido que se produce de manera natural o uno que no se produce de manera natural que porta, por ejemplo, radioisótopos (por ejemplo, ¹²⁵I, ³⁵S), grupos fluorescentes o luminescentes,

biotina, haptenos, antígenos y enzimas. Existen muchos Ac comercializados frente a marcadores, tales como c-myc, HA, VSV-G, HSV, V5, His y FLAG. Además, los anticuerpos frente a marcadores utilizados en la invención pueden producirse utilizando procedimientos convencionales para producir anticuerpos, por ejemplo, mediante la producción de anticuerpos monoclonales (Campbell, A.M., *Monoclonal Antibodies Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Ámsterdam, Países Bajos (1984); St. Groth *et al.*, *J. Immunology*, (1990) 35: 1-21; y Kozbor *et al.*, *Immunology Today* (1983) 4:72). Los anticuerpos antimarcador pueden marcarse entonces de manera detectable a través de la utilización de radioisótopos, marcadores de afinidad (tales como biotina, avidina, etc.), marcadores enzimáticos (tales como peroxidase de rábano, fosfatasa alcalina, etc.) utilizando procedimientos bien conocidos en la materia, tales como los descritos en la solicitud internacional WO 00/70023 y (Harlour y Lane (1989) *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, págs. 1-726).

Los ensayos para detectar marcadores comprenden de manera no limitativa análisis de inmunotransferencia de tipo Western, inmunohistoquímica, Elisa, análisis de FACS, ensayos enzimáticos y autorradiografía. Los expertos en la materia conocen bien los medios para realizar estos ensayos. Por ejemplo, pueden detectarse radiomarcadores utilizando película fotográfica o contadores de centelleo o marcadores fluorescentes utilizando un fotodetector para detectar la luz emitida. Los marcadores enzimáticos normalmente se detectan proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima en el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan visualizando simplemente el marcador coloreado.

El marcador puede utilizarse adicionalmente para aislar la IgA1 proteasa de otro material celular. Por ejemplo, mediante inmunoprecipitación, o mediante la utilización de columnas de afinidad de anticuerpo antimarcador o perlas conjugadas con anticuerpo antimarcador. Cuando se utiliza una cola de HIS, el aislamiento puede realizarse utilizando una columna de quelato de metal (Véase Hochuli en *Genetic Engineering: Principles and Methods* ed. JK Setlow, Plenum Press, NY, cáp.18, págs. 87-96). Los medios para realizar estos tipos de purificación se conocen bien en la materia.

En una forma de realización preferida, se utiliza un anticuerpo antimarcador para generar un inmunocomplejo de IgA1 proteasa de manera que la IgA1 proteasa conserva la actividad enzimática una vez complejada. Un inmunocomplejo de este tipo puede utilizarse en preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades por deposición de IgA1. Por ejemplo, se cree que un inmunocomplejo de IgA1, cuando se administra a un paciente, queda atrapado en los glomérulos del riñón, un sitio de deposición de IgA1 en la nefropatía por IgA y la enfermedad de púrpura de Henoch-Schoenlein.

III. Tratamiento de enfermedades por deposición de IgA1

En la presente memoria, se utilizan IgA1 proteasas como agentes terapéuticos para tratar enfermedades por deposición de IgA1. Se sabe que la deposición anómala de moléculas de IgA1 produce insuficiencia renal, formación de ampollas cutáneas, exantema, artritis, hemorragia gastrointestinal y dolor abdominal.

Nefropatía por IgA

En la presente memoria se da a conocer un procedimiento para tratar la nefropatía por IgA mediante la administración a un paciente que necesita tal tratamiento de una IgA1 proteasa. La nefropatía por IgA es una enfermedad del riñón. La enfermedad se considera una glomerulonefritis mediada por inmunocomplejo, que se caracteriza por la deposición granular de IgA1 en las áreas mesangiales glomerulares. Da como resultado neuropatía y se define por cambios proliferativos en las células mesangiales glomerulares.

La nefropatía por IgA es uno de los tipos más comunes de glomerulonefritis cónica y una causa frecuente de enfermedad renal en fase terminal.

Dermatitis herpetiforme

En la presente memoria se da a conocer un procedimiento para tratar la dermatitis herpetiforme (DH) mediante la administración a un paciente que necesita tal tratamiento de una IgA1 proteasa. La dermatitis herpetiforme es una enfermedad cutánea de formación de ampollas crónica asociada con depósitos de IgA1 en la unión dermoepidérmica (Hall, RP & T.J. Lawley, *J. Immunol.* (1985) 135(3): 1760-5). Los pacientes con DH presentan depósitos granulares de IgA1 y presentan una enteropatía por sensibilidad al gluten asociada (GSE).

Púrpura de Henoch-Schoenlein

En la presente memoria se da a conocer un procedimiento para tratar la púrpura de Henoch-Schoenlein (HS) mediante la administración a un paciente que necesita dicho tratamiento de una IgA1 proteasa. La púrpura de Henoch-Schoenlein es una enfermedad cutánea y renal. La HSP se caracteriza por deposición de inmunocomplejos que contienen IgA1 en tejido. La enfermedad se diagnostica observando la evidencia de deposición de IgA1 en el tejido cutáneo o el riñón mediante microscopía de inmunofluorescencia. Las manifestaciones clínicas normalmente incluyen exantema; artralgias; dolor abdominal; y enfermedad renal.

Modelos animales

El efecto terapéutico de las IgA proteasas de la presente invención pueden someterse a prueba en cualquier modelo animal adecuado conocido por los expertos en la materia. A continuación se describen algunos modelos animales ejemplificativos.

1. Nefropatía por IgA

Se dispone de varios modelos animales de ratas y ratones de nefropatía por IgA y son útiles en la presente invención. Estos modelos se describen en Emancipator, S. N. *et al.*, (1987) Animal models of IgA Nephropathy in IgA Nephropathy. A. R. Clarkson, editor. Martinus Nijhoff publishing, Boston. 188-203. Un modelo ejemplificativo se describe en Gesualdo L. *et al.*, (1990) J. Clin. Invest. 86: 715-722. En resumen, se inyecta un complejo de anticuerpo IgA/sulfato de dextrano a ratones. El inmunocomplejo se aloja en el riñón y los ratones presentan glomerulonefritis que se asemeja a los casos típicos de neuropatía por IgA humana. A continuación se describe con mayor detalle cómo se realiza y se utiliza el modelo para someter a prueba agentes terapéuticos.

Se preparan inmunocomplejos solubles de sulfato de dextrano (500 kD, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e IgA monoclonal anti-glucósido β 1-6 (J558: Litton Bionetics, Kensington, MD) con un exceso de tres veces (26,5 mg de dextrano/mg de J558 (modelo de nefropatía); 22,0 mg de dextrano/mg de MOPC 104 E (control normal)). Los complejos que contiene 3 mg de anticuerpo se inyectan en ratones Swiss-Webster a través de una inyección en la vena de la cola. Tras 1 hora, el momento de máxima deposición de complejos de IgA en el riñón, se inyecta a los ratones por vía intraperitoneal múltiples dosis de o bien solución salina o bien agente terapéutico a intervalos dados, tales como intervalos de 10 minutos. Se sacrifica a los ratones 1 hora tras la última inyección.

Entonces se aíslan los riñones de cada ratón para comprobar la deposición de IgA1 y la morfología mediante microscopía óptica, de inmunofluorescencia y electrónica.

En resumen, para monitorizar la deposición de IgA1, se tiñen muestras congeladas instantáneamente de corteza renal, se cortan con criostato a 4 μ m, se tiñen con fracciones de IgG marcadas con fluoresceína de antiseros de cabra específicos para IgA de ratón (US Biochemical Corp) mediante inmunofluorescencia directa para puntuar de manera semicuantitativa los depósitos de IgA1 (Nakazawa, M. *et al.*, (1986) Lab. Invest. 55:551-556, y Nakazawa, M. *et al.*, (1986) J. Exp. Med. 164:1973-1987). Se considera que un agente terapéutico es un agente eficaz cuando el número de depósitos de IgA1 puntuado se reduce aproximándose al número de depósitos de IgA1 observados en un riñón normal.

Se puntúan los cambios morfológicos, tales como la expansión de la matriz mesangial y la hiper celularidad mesangial, tiñendo cortes de corteza renal con reactivo de PAS (Gesualdo, L. *et al.*, (1990) J. Clin. Invest. 86: 715-722). En resumen, la corteza renal se fija en formalina al 10%, se embebe en parafina y se tiñe. Se puntúa la expansión de la matriz mesangial y la hiper celularidad mesangial de manera semicuatitativa según los procedimientos descritos en Nakazawa, M. *et al.* (1986) Lab. Invest. 55:551-556, y Nakazawa, M. *et al.* (1986) J. Exp. Med. 164:1973-1987.

La matriz mesangial normal se puntúa como 0. La expansión de la matriz mesangial se puntúa como +1 cuando se observan tallos mesangiales ensanchados, +2 cuando se observa invasión de la matriz en las luces capilares, y +3 cuando se observa ensanchamiento manifiesto del tallo mesangial junto con una disminución en la luz capilar. Se considera que un agente terapéutico es un agente eficaz cuando se reduce la expansión de la matriz mesangial aproximándose a la morfología de la matriz observada en un riñón normal, por ejemplo con una puntuación de +2, o +1, o 0.

La celularidad mesangial normal se puntúa como 0 y se define como 3 o menos núcleos celulares por área mesangial. La hiper celularidad se puntúa como +1 cuando se observan de 4 a 6 núcleos celulares por área mesangial, como +2 cuando se observan de 4 a 6 núcleos celulares por área mesangial en la mayoría de las áreas pero algunas áreas tienen 7 o más núcleos, y como +3 cuando se observan 7 o más núcleos celulares por área mesangial en la mayoría de las áreas. Se considera que un agente terapéutico es un agente eficaz cuando se reduce la hiper celularidad mesangial aproximándose a la observada en un riñón normal, por ejemplo con una puntuación de +2, o +1, o 0.

El área glomerular total, el área de la matriz y la celularidad glomerular también se cuantifican en glomérulos seleccionados al azar de cada ratón mediante morfometría por ordenador (Cue image analysis system, Olympus Corp., Columbia, MD.) (Gesualdo L. *et al.*, (1990) J. Clin. Invest. 86: 715-722). En resumen, se fijan cubos de corteza en glutaraldehído al 2,5% en cacodilato de sodio 0,1 M, se fijan posteriormente en OsO₄ al 1% y se embeben en resina epoxidica de Spurr (Polysciences, Inc. Warrington, PA). Se tiñen cortes de 50-70 nm con acetato de uranilo e hidróxido de plomo. Se examinan las rejillas codificadas en un microscopio JEOL JEM 100EX y se semicuantifican la matriz, la celularidad y los inmunodepósitos tal como se describe en Nakazawa, M. *et al.*, (1986) J. Exp. Med. 164:1973-1987.

La hematuria (la presencia de glóbulos rojos en la orina) y la proteinuria (la presencia de proteína en la orina) también son una medida adecuada de la neuropatía por IgA. En resumen, se colocan ratones en cajas metabólicas y se recoge la orina durante 24 horas. Entonces se centrifuga la orina y se somete a ensayo para determinar la proteína mediante turbidimetría en ácido sulfosalicílico al 3% y la hematuria mediante microscopía, tal como se describe en Nakazawa, M. *et al.*, (1986) J. Exp. Med. 164:1973-1987. Normalmente, un ratón normal sin nefropatía por IgA presentará menos de tres glóbulos rojos por campo de gran aumento (40X), mientras que los ratones con nefropatía por IgA presentarán más de 10 glóbulos rojos por campo de gran aumento. Una reducción en el número de glóbulos rojos por campo de gran aumento es indicativa de que el agente terapéutico es eficaz para la nefropatía por IgA. Se somete a prueba a los ratones para determinar la hematuria y la proteinuria antes del tratamiento para determinar el valor de referencia indicativo de la enfermedad. Una reducción en el valor de referencia, en comparación con el valor para la hematuria y la proteinuria obtenido antes del tratamiento, del 5%, 10%, 30%, 40% preferentemente del 50%, y más preferentemente superior a 50% tras el tratamiento con el agente terapéutico es indicativo de que el agente es eficaz para el tratamiento de la neuropatía por IgA1.

IV Dosificación, formulación y administración

En la presente memoria, se utilizan IgA proteasas bacterianas para tratar enfermedades por deposición de IgA. La IgA1 proteasa de la presente invención puede utilizarse en una composición que se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición de este tipo también puede contener diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizadores y otros materiales bien conocidos en la materia. En un aspecto, la IgA1 proteasa se compleja con un anticuerpo para formar un inmunocomplejo terapéutico. Un inmunocomplejo terapéutico de este tipo es particularmente útil para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la deposición de IgA1 en el riñón puesto que se cree que inmunocomplejos grandes se alojan en el glomérulo renal tras la administración.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del/de los principio(s) activo(s). Las características del vehículo dependerán de la vía de administración. Tales vehículos comprenden de manera no limitativa, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. Para los fármacos administrados por vía oral, los vehículos farmacéuticamente aceptables comprenden de manera no limitativa excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes de unión, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfatos de sodio y calcio, y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido algínico son agentes disgregantes adecuados. Los agentes de unión pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, generalmente será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal.

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden formarse con ácidos inorgánicos tales como acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenesulfonato, bisulfato butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yohidrato, 2-hidroxiitanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Las sales básicas incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio, sal con bases orgánicas tales como sales de dicitclohexilamina, N-metil-D-glucamina, y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, etc. Además, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. De ese modo de obtienen productos dispersables o solubles en agua o aceite.

La composición también puede contener otros agentes, que o bien potencian la actividad de la composición, o bien complementan su actividad o utilización en el tratamiento, o bien mantienen la actividad del agente terapéutico en almacenamiento. Tales factores y/o agentes adicionales pueden incluirse en la composición para producir un efecto sinérgico o para minimizar los efectos secundarios. Además, la administración de la composición puede realizarse simultáneamente con otras terapias.

La administración del agente terapéutico puede llevarse a cabo de una variedad de formas convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, aplicación tópica o inyección cutánea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral o intravenosa.

Las composiciones que contienen el agente terapéutico pueden administrarse por vía intravenosa, tal como mediante inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. La expresión "dosis unitaria" cuando se utiliza en referencia con una composición terapéutica, se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificación unitaria para el sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido, es decir, el excipiente o vehículo.

Los modos de administración del agente terapéutico incluyen infusión e inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarterial. Las composiciones farmacéuticas para la inyección parenteral comprenden disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, así como polvos estériles para su reconstitución en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su utilización. Los ejemplos de excipientes, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la utilización de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante la utilización de tensioactivos. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes, y/o compuestos para proteger el determinante inmunogénico del agente terapéutico. La prevención de la acción de microorganismos puede mejorarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos tales como parabenos, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de una forma farmacéutica inyectable puede llevarse a cabo mediante la inclusión de agentes, tales como monoestearato de aluminio y gelatina, que retrasan la absorción. Se obtienen formas de liberación lenta inyectables formando matrices microencapsuladas del agente terapéutico en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida, poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Dependiendo de la razón del agente terapéutico con respecto al polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la tasa de liberación del agente terapéutico. Las formulaciones inyectables de liberación lenta también se preparan atrapando el agente terapéutico en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales. Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene las bacterias o mediante la incorporación de agentes de esterilización en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otros medios inyectables estériles justo antes de su utilización.

Las formulaciones incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral), nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), intrauterina, vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intracraneal, intratraqueal, y epidural). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria y pueden prepararse mediante técnicas farmacéuticas convencionales. Tales técnicas incluyen la etapa que consiste en asociar el principio activo y el/los vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones para inyección improvisada a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a la cantidad total de cada principio activo de la composición farmacéutica o procedimiento que es suficiente para mostrar un beneficio significativo en un paciente, es decir, tratamiento, curación, prevención o mejora del estado médico relevante, o un aumento en la tasa de tratamiento, curación, prevención o mejora de tales estados. Cuando se aplica a un principio activo individual, administrado solo, la expresión se refiere a ese principio solo. Cuando se aplica a una combinación, la expresión se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico ya se administren en combinación, en serie, o simultáneamente. En general, una composición se administrará en una dosis única en el intervalo de 100 µg - 10 mg/kg de peso corporal, preferentemente en el intervalo de 1 µg - 100 mg/kg de peso corporal. Esta dosificación puede repetirse de manera diaria, semanal, mensual, anual, o según considere apropiado el médico que trate.

Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico se administra por vía oral, la composición puede estar en forma de un líquido, la composición contiene aproximadamente desde el 0,5 hasta el 90% en peso de proteína, y preferentemente aproximadamente desde el 1 hasta el 50% de proteína.

Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico se administra mediante inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, la proteína está en forma de una disolución acuosa, aceptable por vía parenteral, libre de pirógeno. La preparación de tales disoluciones de proteína aceptables por vía parenteral, considerando particularmente la tracción, isotonicidad, estabilidad, y similares, resultará evidente para el experto en la materia. Una composición preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debe contener, además de la proteína, un vehículo isotónico tal como cloruro de sodio para inyección, solución de Ringer para inyección, dextrosa para inyección, dextrosa y cloruro de sodio para inyección, solución de Ringer lactato para inyección, u otro vehículo tal como se conoce en la materia. La composición de la presente invención también puede contener estabilizantes,

conservantes, tampones, antioxidantes, u otros aditivos conocidos por los expertos en la materia.

La administración tópica, en la que la composición se pone en contacto con tejido(s), puede ser adecuada para la dermatitis herpetiforme. Mediante "poner en contacto" se hace referencia a no sólo la aplicación tópica, sino también a los modos de administración que introducen la composición en los tejidos, o en las células de los tejidos.

La utilización de sistemas de administración de liberación controlada o liberación sostenida también se incluye en la invención. Tales sistemas son sumamente deseables en situaciones en las que la cirugía es difícil o imposible, por ejemplo, en pacientes debilitados por la edad o por el propio transcurso de la enfermedad, o cuando el análisis de riesgo – beneficio indica el control en vez de la cura.

Una matriz de liberación sostenida, tal como se utiliza en la presente memoria, es una matriz realizada en materiales, normalmente polímeros, que pueden degradarse mediante hidrólisis enzimática o ácida/básica o mediante disolución. Una vez insertada en el organismo, la matriz se activa mediante enzimas y líquidos corporales. La matriz de liberación sostenida se selecciona de manera deseable de materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (poli(ácido láctico)), poliglicolida (polímero de ácido glicólico), polilactida co-glicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliproteínas, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinilpropileno, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de uno de o bien, polilactida, poliglicolida, o bien polilactida co-glicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

La cantidad de agente terapéutico en la composición farmacéutica dependerá de la naturaleza y la gravedad del estado que se esté tratando, y de la naturaleza de los tratamientos anteriores a los que se haya sometido el paciente. Finalmente, el médico que atiende decidirá la cantidad del agente terapéutico con el que tratar a cada paciente individual. Inicialmente, el médico que atiende administrará dosis bajas del agente terapéutico y observará la respuesta del paciente. Pueden administrarse dosis mayores hasta que se obtiene el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese momento ya no se aumenta la dosificación.

La duración de la terapia intravenosa utilizando la composición farmacéutica variará dependiendo de la gravedad de de la enfermedad que se esté tratando y del estado y la posible respuesta idiosincrásica de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación del agente terapéutico de la presente invención estará en el intervalo de 12 a 72 horas de administración intravenosa continua, a una tasa de aproximadamente 30 mg/hora. Finalmente, el médico que atiende decidirá la duración apropiada de la terapia intravenosa utilizando la composición farmacéutica.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de la IgA1 proteasa marcada

Se ha fusionado en marco una cola de His en la IgA1 proteasa de *Haemophilus influenzae* mediante mutagénesis dirigida al sitio basada en PCR utilizando el plásmido pFG26 que contiene la secuencia de ADN que codifica para la IgA1 proteasa de *Haemophilus influenzae*. Se generaron dos fragmentos de PCR de tal como se ilustra en la figura 4. El primer fragmento, Xba I y fragmento de pml 1, que contiene la cola de His recién insertada y el sitio de pml 1 se generó utilizando cebadores de oligonucleótido "HFD6His1" (cebador 1) y "HFD6His2" (cebador 2) mostrados a continuación. El segundo fragmento, pml I y el fragmento de Ace I, se generó utilizando el cebador 3 y el cebador 4 también mostrados a continuación.

Cebador 1: HFD-5 XbaI: 5' GATCCGCTTACCAATTATGC 3' (SEC ID n°: 20)

Cebador 2: HFD6His1:

**5'CTTGGTACGCTAGGCACGTGATGATGATGATGAGGTGTTGTGATATTT
GTCG-3' (SEQ ID NO:21)**

Cebador 3: HFD6His2: 5'-CCTAATAATATTCAAGCTCACGTGCCTAGCGTACC-3' (SEC ID n°: 22)

Cebador 4: HFD-F-ACCI: 5'-TTCAGCAGAAGTCTCTTGC-3' (SEC ID n°: 23)

Tras la amplificación de los dos fragmentos mediante PCR, se digirieron los fragmentos o bien con Xb a I y Pml I o bien con Pml I y Acc I y se ligaron en sitios de Xba I y Acc I del plásmido pFG26 original utilizando técnicas convencionales. Se confirmó la mutación mediante la secuencia de ADN y se designó al nuevo plásmido como pJQ/Rd6His. Los fragmentos se diseñaron de manera que codones de ADN para seis histidinas sustituyeran a los codones originales en la posición 1007-1012 de la IgA1 proteasa; asn-asn-ile-gln-ala-asp (SEC ID n°: 24).

Ejemplo 2. Generación de una cepa bacteriana que expresa la IgA1 proteasa marcada

Se generó una cepa bacteriana de *Haemophilus influenzae* que expresa sólo una IgA1 proteasa marcada que es enzimáticamente activa mediante técnicas de recombinación convencionales. En resumen, se cortó el plásmido pJQ/Rd6His que se generó en el ejemplo 1 con las enzimas de restricción Cla I y Nde I. El gen se aisló y se transformó en una cepa bacteriana Rd de *Haemophilus influenzae* (Rd 3-13) que produce una IgA1 proteasa sin actividad enzimática (Plaut AG, Qiu, J, Grundy, F. y Wright, A. J Infect Dis. (1992) Jul;1 66(1):43-52) para permitir la inserción de la IgA1 proteasa con cola de His en el genoma bacteriano mediante recombinación. Entonces se examinaron las bacterias para determinar el restablecimiento de la actividad enzimática sometiendo a prueba unos medios de crecimiento bacteriano de colonias seleccionadas para comprobar la presencia de proteasa activa utilizando IgA1 humana como sustrato.

La introducción de la mutación de 6-His en la enzima activa se confirmó verificando la presencia de un sitio de Pml I utilizando un fragmento de PCR del ADN genómico. Esta cepa se designó Rd 6His.

La cepa Rd 6His presentaba una tasa de crecimiento y una morfología de colonia idénticas a la cepa Rd de tipo natural. El rendimiento de actividad de la IgA proteasa y el tamaño de la enzima fueron indistinguibles de los del tipo natural. Aunque la mutación de 6 His se introdujo sólo a una distancia de dos aminoácidos del sitio a autoproteolítico, no hubo ningún problema detectable ni con la secreción de la enzima de la célula bacteriana, ni con su autoprocesamiento.

Se unió un anticuerpo monoclonal anti-5His (Qiagen, Inc) a la proteasa determinado mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Cuando se combinó con el anticuerpo monoclonal en disolución, la IgA proteasa de Rd 6His mantuvo su actividad completa.

Ejemplo 3.

El efecto terapéutico de la IgA1 proteasa para el tratamiento de la nefropatía por IgA puede someterse a prueba en un modelo de ratón para nefropatía por IgA.

Se utilizan múltiples ratones Swiss-Webster (Laboratorios Charles River) por experimento y se dividen en grupos (normalmente, 10 ratones/grupo). Los ratones se colocan en primer lugar en una cámara metabólica, y se recoge orina durante 24 horas para determinar la cantidad de hematuria (la presencia de glóbulos rojos en la orina) y proteinuria (la presencia de proteína presente en la orina) en orina. Esto proporciona un valor de base para hematuria y proteinuria en ratones sanos normales. Entonces se induce nefropatía por IgA en los ratones tal como se describe en Gesualdo L. *et al*, (1990) J. Clin. Invest. 86: 715-722.

Tras la inducción de nefropatía, se inyectaron a los ratones por vía intraperitoneal múltiples dosis de solución salina (control), IgA1 proteasa inactiva (control), IgA1 proteasa activa, e IgA1 proteasa complejada con inmunoglobulina (por ejemplo complejada con anticuerpo antimarcador, o anticuerpo anti-IgA1 proteasa). Un régimen de dosificación ejemplo incluye la inyección de 0,1-0,5 mg de proteasa por vía intraperitoneal, dos veces al día durante 5 días. La dosificación y el régimen de dosificación pueden variarse según el efecto terapéutico observado en experimentos piloto, por ejemplo en un único ratón. Normalmente, se seleccionan dosis máximas que no provocan efectos toxicológicos o histológicos clínicos. Cuando la IgA1 proteasa está complejada con un ligando, se usan concentraciones variadas de ligando para determinar la razón proteasa/ligando más eficaz. También puede modificarse el modo de administración, por ejemplo la administración puede realizarse mediante inyección intravenosa.

Se sometió a prueba a los ratones 1-24 h tras la administración de la última dosis de agente terapéutico, para determinar el alivio de la nefropatía por IgA midiendo la hematuria y la proteinuria en ratones que no recibieron el agente terapéutico. Una reducción en la cantidad de hematuria y proteinuria en comparación con los ratones que no recibieron agente terapéutico, aproximándose a los valores observados en ratones sanos normales es indicativo de éxito terapéutico.

También se evalúan las medidas morfológicas de la nefropatía por IgA. Se sacrifican los ratones tras la recogida de orina y se extraen los riñones para determinar la cantidad de i) deposición de IgA1, ii) expansión de la matriz mesangial y ii) hiper celularidad mensangial tal como se describe. Una reducción en los parámetros i-iii en comparación con los observados en ratones que no recibieron el agente terapéutico es indicativa de éxito terapéutico

Ejemplo 4.

El efecto terapéutico de la IgA1 proteasa para el tratamiento de la dermatitis herpetiforme puede someterse a prueba en un modelo de ratón para dermatitis herpetiforme.

Ejemplo 5.

El efecto terapéutico de la IgA1 proteasa para el tratamiento de la púrpura de Henoch-Schoenlein puede someterse a prueba en un modelo de ratón para púrpura de Henoch-Schoenlein.

5

Listado de secuencias

<110> New England Medical Center Hospitals, Inc.
Plaut, Andrew G
Qiu, Jiazhou

10

<120> Tratamiento de enfermedades por deposición de IgA1

<130> 28154/2068

15

<140> Sin asignar todavía

<141> 05-03-2004

<150> US 60/453055

20

<151> 07-07-2003

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.2

25

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

30

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser
1 5 10 15

Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys
20 25

35

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

40

<400> 2

Ile Thr Thr Pro Asn Asn Ile Gln Ala Asp Val Pro Ser
1 5 10

45

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Secuencia de proteasa mutada

<400> 3

Ile Thr Thr Pro His His His His His His Val Pro Ser
1 5 10

55

<210> 4

<211> 1694
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

5 <400> 4

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

Ile Leu Ser Gln Asp Pro Leu Thr Asn Tyr Ala Val Leu Gly Asp Ser
 275 280 285
 Gly Ser Pro Leu Phe Val Tyr Asp Arg Glu Lys Gly Lys Trp Leu Phe
 290 295 300
 Leu Gly Ser Tyr Asp Phe Trp Ala Gly Tyr Asn Lys Lys Ser Trp Gln
 305 310 315 320
 Glu Trp Asn Ile Tyr Lys Pro Glu Phe Ala Lys Thr Val Leu Asp Lys
 325 330 335
 Asp Thr Ala Gly Ser Leu Thr Gly Ser Asn Thr Gln Tyr Asn Trp Asn
 340 345 350
 Pro Thr Gly Lys Thr Ser Val Ile Ser Asn Gly Ser Glu Ser Leu Asn
 355 360 365
 Val Asp Leu Phe Asp Ser Ser Gln Asp Thr Asp Ser Lys Lys Asn Asn
 370 375 380
 His Gly Lys Ser Val Thr Leu Arg Gly Ser Gly Thr Leu Thr Leu Asn
 385 390 395 400
 Asn Asn Ile Asp Gln Gly Ala Gly Gly Leu Phe Phe Glu Gly Asp Tyr
 405 410 415
 Glu Val Lys Gly Thr Ser Asp Ser Thr Thr Trp Lys Gly Ala Gly Val
 420 425 430
 Ser Val Ala Asp Gly Lys Thr Val Thr Trp Lys Val His Asn Pro Lys
 435 440 445
 Ser Asp Arg Leu Ala Lys Ile Gly Lys Gly Thr Leu Ile Val Glu Gly
 450 455 460
 Lys Gly Glu Asn Lys Gly Ser Leu Lys Val Gly Asp Gly Thr Val Ile
 465 470 475 480
 Leu Lys Gln Gln Ala Asp Ala Asn Asn Lys Val Lys Ala Phe Ser Gln
 485 490 495
 Val Gly Ile Val Ser Gly Arg Ser Thr Val Val Leu Asn Asp Asp Lys
 500 505 510
 Gln Val Asp Pro Asn Ser Ile Tyr Phe Gly Phe Arg Gly Gly Arg Leu
 515 520 525
 Asp Ala Asn Gly Asn Asn Leu Thr Phe Glu His Ile Arg Asn Ile Asp
 530 535 540
 Asp Gly Ala Arg Leu Val Asn His Asn Thr Ser Lys Thr Ser Thr Val
 545 550 555 560
 Thr Ile Thr Gly Glu Ser Leu Ile Thr Asp Pro Asn Thr Ile Thr Pro
 565 570 575

Tyr Asn Ile Asp Ala Pro Asp Glu Asp Asn Pro Tyr Ala Phe Arg Arg
 580 585 590
 Ile Lys Asp Gly Gly Gln Leu Tyr Leu Asn Leu Glu Asn Tyr Thr Tyr
 595 600 605
 Tyr Ala Leu Arg Lys Gly Ala Ser Thr Arg Ser Glu Leu Pro Lys Asn
 610 615 620
 Ser Gly Glu Ser Asn Glu Asn Trp Leu Tyr Met Gly Lys Thr Ser Asp
 625 630 635 640
 Glu Ala Lys Arg Asn Val Met Asn His Ile Asn Asn Glu Arg Met Asn
 645 650 655
 Gly Phe Asn Gly Tyr Phe Gly Glu Glu Glu Gly Lys Asn Asn Gly Asn
 660 665 670
 Leu Asn Val Thr Phe Lys Gly Lys Ser Glu Gln Asn Arg Phe Leu Leu
 675 680 685
 Thr Gly Gly Thr Asn Leu Asn Gly Asp Leu Lys Val Glu Lys Gly Thr
 690 695 700
 Leu Phe Leu Ser Gly Arg Pro Thr Pro His Ala Arg Asp Ile Ala Gly
 705 710 715 720
 Ile Ser Ser Thr Lys Lys Asp Gln His Phe Ala Glu Asn Asn Glu Val
 725 730 735
 Val Val Glu Asp Asp Trp Ile Asn Arg Asn Phe Lys Ala Thr Asn Ile
 740 745 750
 Asn Val Thr Asn Asn Ala Thr Leu Tyr Ser Gly Arg Asn Val Ala Asn
 755 760 765
 Ile Thr Ser Asn Ile Thr Ala Ser Asp Asn Ala Lys Val His Ile Gly
 770 775 780
 Tyr Lys Ala Gly Asp Thr Val Cys Val Arg Ser Asp Tyr Thr Gly Tyr
 785 790 795 800
 Val Thr Cys Thr Thr Asp Lys Leu Ser Asp Lys Ala Leu Asn Ser Phe
 805 810 815
 Asn Ala Thr Asn Val Ser Gly Asn Val Asn Leu Ser Gly Asn Ala Asn
 820 825 830
 Phe Val Leu Gly Lys Ala Asn Leu Phe Gly Thr Ile Ser Gly Thr Gly
 835 840 845
 Asn Ser Gln Val Arg Leu Thr Glu Asn Ser His Trp His Leu Thr Gly
 850 855 860
 Asp Ser Asn Val Asn Gln Leu Asn Leu Asp Lys Gly His Ile His Leu
 865 870 875 880

Asn Ala Gln Asn Asp Ala Asn Lys Val Thr Thr Tyr Asn Thr Leu Thr
 885 890 895
 Val Asn Ser Leu Ser Gly Asn Gly Ser Phe Tyr Tyr Leu Thr Asp Leu
 900 905 910
 Ser Asn Lys Gln Gly Asp Lys Val Val Val Thr Lys Ser Ala Thr Gly
 915 920 925
 Asn Phe Thr Leu Gln Val Ala Asp Lys Thr Gly Glu Pro Thr Lys Asn
 930 935 940
 Glu Leu Thr Leu Phe Asp Ala Ser Asn Ala Thr Arg Asn Asn Leu Asn
 945 950 955 960
 Val Ser Leu Val Gly Asn Thr Val Asp Leu Gly Ala Trp Lys Tyr Lys
 965 970 975
 Leu Arg Asn Val Asn Gly Arg Tyr Asp Leu Tyr Asn Pro Glu Val Glu
 980 985 990
 Lys Arg Asn Gln Thr Val Asp Thr Thr Asn Ile Thr Thr Pro Asn Asn
 995 1000 1005
 Ile Gln Ala Asp Val Pro Ser Val Pro Ser Asn Asn Glu Glu Ile
 1010 1015 1020
 Ala Arg Val Glu Thr Pro Val Pro Pro Pro Ala Pro Ala Thr Pro
 1025 1030 1035
 Ser Glu Thr Thr Glu Thr Val Ala Glu Asn Ser Lys Gln Glu Ser
 1040 1045 1050
 Lys Thr Val Glu Lys Asn Glu Gln Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ala
 1055 1060 1065
 Gln Asn Gly Glu Val Ala Glu Glu Ala Lys Pro Ser Val Lys Ala
 1070 1075 1080
 Asn Thr Gln Thr Asn Glu Val Ala Gln Ser Gly Ser Glu Thr Glu
 1085 1090 1095
 Glu Thr Gln Thr Thr Glu Ile Lys Glu Thr Ala Lys Val Glu Lys
 1100 1105 1110
 Glu Glu Lys Ala Lys Val Glu Lys Asp Glu Ile Gln Glu Ala Pro
 1115 1120 1125
 Gln Met Ala Ser Glu Thr Ser Pro Lys Gln Ala Lys Pro Ala Pro
 1130 1135 1140
 Lys Glu Val Ser Thr Asp Thr Lys Val Glu Glu Thr Gln Val Gln
 1145 1150 1155
 Ala Gln Pro Gln Thr Gln Ser Thr Thr Val Ala Ala Ala Glu Ala
 1160 1165 1170

Thr Ser Pro Asn Ser Lys Pro Ala Glu Glu Thr Gln Pro Ser Glu
 1175 1180 1185
 Lys Thr Asn Ala Glu Pro Val Thr Pro Val Val Ser Lys Asn Gln
 1190 1195 1200
 Thr Glu Asn Thr Thr Asp Gln Pro Thr Glu Arg Glu Lys Thr Ala
 1205 1210 1215
 Lys Val Glu Thr Glu Lys Thr Gln Glu Pro Pro Gln Val Ala Ser
 1220 1225 1230
 Gln Ala Ser Pro Lys Gln Glu Gln Ser Glu Thr Val Gln Pro Gln
 1235 1240 1245
 Ala Val Leu Glu Ser Glu Asn Val Pro Thr Val Asn Asn Ala Glu
 1250 1255 1260
 Glu Val Gln Ala Gln Leu Gln Thr Gln Thr Ser Ala Thr Val Ser
 1265 1270 1275
 Thr Lys Gln Pro Ala Pro Glu Asn Ser Ile Asn Thr Gly Ser Ala
 1280 1285 1290
 Thr Ala Ile Thr Glu Thr Ala Glu Lys Ser Asp Lys Pro Gln Thr
 1295 1300 1305
 Glu Thr Ala Ala Ser Thr Glu Asp Ala Ser Gln His Lys Ala Asn
 1310 1315 1320
 Thr Val Ala Asp Asn Ser Val Ala Asn Asn Ser Glu Ser Ser Asp
 1325 1330 1335
 Pro Lys Ser Arg Arg Arg Arg Ser Ile Ser Gln Pro Gln Glu Thr
 1340 1345 1350
 Ser Ala Glu Glu Thr Thr Ala Ala Ser Thr Asp Glu Thr Thr Ile
 1355 1360 1365
 Ala Asp Asn Ser Lys Arg Ser Lys Pro Asn Arg Arg Ser Arg Arg
 1370 1375 1380
 Ser Val Arg Ser Glu Pro Thr Val Thr Asn Gly Ser Asp Arg Ser
 1385 1390 1395
 Thr Val Ala Leu Arg Asp Leu Thr Ser Thr Asn Thr Asn Ala Val
 1400 1405 1410
 Ile Ser Asp Ala Met Ala Lys Ala Gln Phe Val Ala Leu Asn Val
 1415 1420 1425
 Gly Lys Ala Val Ser Gln His Ile Ser Gln Leu Glu Met Asn Asn
 1430 1435 1440
 Glu Gly Gln Tyr Asn Val Trp Val Ser Asn Thr Ser Met Asn Glu
 1445 1450 1455

Asn Tyr Ser Ser Ser Gln Tyr Arg Arg Phe Ser Ser Lys Ser Thr
 1460 1465 1470
 Gln Thr Gln Leu Gly Trp Asp Gln Thr Ile Ser Asn Asn Val Gln
 1475 1480 1485
 Leu Gly Gly Val Phe Thr Tyr Val Arg Asn Ser Asn Asn Phe Asp
 1490 1495 1500
 Lys Ala Ser Ser Lys Asn Thr Leu Ala Gln Val Asn Phe Tyr Ser
 1505 1510 1515
 Lys Tyr Tyr Ala Asp Asn His Trp Tyr Leu Gly Ile Asp Leu Gly
 1520 1525 1530
 Tyr Gly Lys Phe Gln Ser Asn Leu Lys Thr Asn His Asn Ala Lys
 1535 1540 1545
 Phe Ala Arg His Thr Ala Gln Phe Gly Leu Thr Ala Gly Lys Ala
 1550 1555 1560
 Phe Asn Leu Gly Asn Phe Gly Ile Thr Pro Ile Val Gly Val Arg
 1565 1570 1575
 Tyr Ser Tyr Leu Ser Asn Ala Asn Phe Ala Leu Ala Lys Asp Arg
 1580 1585 1590
 Ile Lys Val Asn Pro Ile Ser Val Lys Thr Ala Phe Ala Gln Val
 1595 1600 1605
 Asp Leu Ser Tyr Thr Tyr His Leu Gly Glu Phe Ser Val Thr Pro
 1610 1615 1620
 Ile Leu Ser Ala Arg Tyr Asp Thr Asn Gln Gly Ser Gly Lys Ile
 1625 1630 1635
 Asn Val Asn Gln Tyr Asp Phe Ala Tyr Asn Val Glu Asn Gln Gln
 1640 1645 1650
 Gln Tyr Asn Ala Gly Leu Lys Leu Lys Tyr His Asn Val Lys Leu
 1655 1660 1665
 Ser Leu Ile Gly Gly Leu Thr Lys Ala Lys Gln Ala Glu Lys Gln
 1670 1675 1680
 Lys Thr Ala Glu Leu Lys Leu Ser Phe Ser Phe
 1685 1690

<210> 5
 <211> 5085
 <212> ADN
 <213> *Haemophilus influenzae*

<400> 5

atgctaaata aaaaattcaa actcaatttt attgcgctta ctgtcgccta cgcattaacc 60
 ccttatacag aagctgcggt agtgagagac gatgtggatt atcaaatatt tcgtgatttt 120

gcagaaaata aaggagatt ttctgttgg gcaacaaatg tggaagtgag agataaaaat 180
aaccactctt taggcaatgt tttacctaat ggcattccga tgattgattt tagtgttgtg 240
gatgtagata aacgcatcgc cacattgata aatccacaat atgtagtagg tgtaaaacac 300
gttagtaacg gcgtagtgga actacatfff gggaacttaa atggcaatat gaataatggc 360
aatgctaaat cgcaccgaga tgtatcttca gaagaaaata gatatffffc cgttgagaaa 420
aatgagtatc caactaaatt gaatggaaaa gcagtaacta ctgaagatca aactcaaaaa 480
cgccgtgaag actactatat gccacgtctt gataaatttg ttaccgaagt tgcaccaata 540
gaggcttcaa ctgcaagtag tgatgctggc acatataatg atcagaataa atatcctgct 600
tttgaagac taggaagtgg tagtcaattt atttataaaa aaggagataa ttacagctta 660
atfttaaata atcatgaggt tggaggcaat aatcttaaat tgggtggcga tgcctatacc 720
tatggtattg caggcacacc ttataaagta aaccacgaaa ataatggact aattggffff 780
ggcaattcaa aagaggaaca cagcgatcca aaaggaatat tatctcaaga tccgcttacc 840
aattatgctg ttttaggcga cagtggctcc ccattatftg tatatgatag agaaaaagga 900
aaatggctft ttcttgggtc ttatgatftt tgggcaggft ataacaaaa atcttggcaa 960
gaatggaata tttataaacc tgaatftgca aaaactgttc tagataaaga tactgcaggt 1020
tctftaactg gttctaacac ccaatacaat tggaaftcta ctggcaaaac aagcgttatt 1080
tctaattggt ctgaatctct aaatgftgat ttatfcgata gtagtcagga tactgactct 1140
aagaagaaca atcacggaaa aagtgtgact cttagaggaa gtggaacgct taccttaaat 1200
aataatatcg atcaaggcgc aggcggcttg ttctftgaag gagattatga agftaaaggc 1260
actftgata gtaccacttg gaaaggagct ggcgtftctg ftgctgatgg aaaaacagta 1320
acgtggaag tacataacc gaaatctgat cgtftagcta aaatcggcaa aggaacatta 1380
attgtagaag gaaagggaga aaataaagg ftcgctaaaag tgggcgatgg tactgftatc 1440
ttaaaacaac aagctgatgc caataataaa gftaaagcct tftcacaagt aggtatagta 1500
agtgtcgct caactgftgt acttaatgat gataagcaag tagatccaaa ftccatftac 1560
fttgctfta gaggtggtcg attagatgcc aatggcaata atctcactft tgaacatatc 1620
cgtaatattg atgatggcgc aagactagta aatcacaata ccagcaaaac ctctactgta 1680
acaattactg gggaaagtct aattacagat ccaaatacaa ftactccata taatatagac 1740
gcaccagatg aagataatcc ftatgcctft cgacggatta aagatggagg acagctctat 1800

ttaaatttgg	aaaattacac	ttattatgcg	ttaagaaaag	gtgagagcac	tcgttcagaa	1860
ttacctaaaa	atagtggcga	aagcaatgaa	aattggctat	atatgggtaa	aacttccgat	1920
gaagccaaaa	gaaatgtaat	gaaccatatac	aacaacgagc	gtatgaaatgg	ctttaacggg.	1980
tattttggcg	aggaagaggg	taaaaataac	ggtaaatctaa	atgtgacttt	taaaggcaaa	2040
agtgagcaaa	atcgcttttt	attaacaggc	ggaacaaacc	ttaatggcga	tttaaagggt	2100
gaaaaaggca	cattattcct	ttctggcaga	ccaacaccgc	acgcaagaga	tattgcaggt	2160
atttcttcga	caaaaaaaga	tcaacacttt	gctgaaaata	atgaagtggg	agtagaagat	2220
gactggatta	accgcaattt	taaagcaaca	aatattaatg	taaccaataa	cgcaaccctt	2280
tattcaggtc	gcaatgttgc	aaacattact	tcaaatatca	cagcttctga	taatgcaaaa	2340
gtacatatgg	gctataaagc	aggcgatacc	gtttgtgtac	gttctgacta	tacgggctat	2400
gtgacttgca	ctactgacaa	gttatccgat	aaagccctta	atagctttaa	cgccaccaat	2460
gtatctggca	atgtaaattt	atcaggtaat	gcaaactttg	tcttaggcaa	agctaactta	2520
ttcggcacia	ttagcggcac	gggaaatagc	caagtacggt	taaccgaaaa	tagccattgg	2580
catttaacag	gcatagcaa	tgtaaatcag	ttaaatttag	acaaggggca	tattcattta	2640
aatgcacaaa	acgatgcaa	taaagtaact	acataataca	cgctgactgt	gaatagctta	2700
tcaggtaacg	gttcttttcta	ttatttaact	gatctttcca	ataaacaagg	cgacaaaagtt	2760
gttgtaacta	aatccgccac	aggtaacttt	acattacaag	tggcagataa	aacaggcgag	2820
cctacaaaaa	atgaactcac	gctttttgat	gcgtcaaatg	ctacaagaaa	taatttgaat	2880
gtgtcattag	ttgggaatac	cgttgattta	ggtgcttggg	aatataaatt	acgtaatggt	2940
aatggacggt	acgatttgta	taaccagag	gtggaaaaaa	gaaatcaaac	tgctgatacg	3000
acaaatatca	caacacctaa	taatattcaa	gctgatgtgc	ctagcgtacc	aagtaacaat	3060
gaagaaatag	cccgtgttga	aacaccagtt	ccaccacctg	cgctgctac	accatcagag	3120
acaactgaaa	cagtggctga	aaatagtaag	caagaaagta	aaacagtaga	gaaaaacgag	3180
caagacgcaa	ccgagacaac	agctcaaaa	ggagaagttg	cagaagaagc	taaaccaagt	3240
gtaaaagcta	atactcaaac	aatgaagtg	gctcaaagtg	gaagtgaaac	cgaggaaact	3300
caaacgactg	aaataaaaga	aacagctaaa	gtagaaaaag	aggaaaaggc	taaagtagaa	3360
aaagatgaaa	ttcaagaagc	acctcaaatg	gcttctgaaa	cgtctccgaa	acaagcaaag	3420
cctgctccta	aagaagtttc	aactgatacg	aaagtagaag	aaactcaagt	tcaagctcaa	3480
ccgcaaacac	aatcgacaac	tgttgctgcg	gcagaggcaa	cttcgcaaaa	cagtaaacca	3540

gcggaagaaa ctcaaccaag tgaaaaaact aacgctgaac ctgtaacgcc tgtagtatca 3600
 aaaaatcaaa cagaaaatac gaccgaccaa ccaacagaaa gagagaaaac ggctaaagta 3660
 gaaacagaga aaactcaaga accccctcaa gtggcttctc aagcgtctcc gaaacaggaa 3720
 cagtctgaaa ctgttcaacc gcaagcagtg cttgaaagtg aaaatgttcc gactgttaat 3780
 aatgcagaag aagttcaagc tcaactgcaa acacaaacaa gtgcaacagt aagcactaaa 3840
 caacctgcac cagagaattc aataaatact ggatctgcaa ccgcaataac agaaactgct 3900
 gaaaaatccg ataaaccaca aacggaaact ggggcttcga ctgaagatgc tagtcagcat 3960
 aaagcgaata ctgttgcgga taattctgta gcaaataatt cagaaagcag tgatccaaag 4020
 agtagacgta gaagaagtat tagccagcct caagagactt ctgctgaaga aacaacagca 4080
 gcttctactg acgaaacaac aatagctgat aattcaaac gcagtaagcc aaatcgtaga 4140
 agtagaagaa gtgttcgctc ggaaccaact gttacaaatg gcagcgatcg ttctacagta 4200
 gcattgcgcg atctcacaag tacaacacaa aatgcggtaa tttctgatgc aatggcaaaa 4260
 gcacaatttg ttgcattaaa tgtggggaaa gcagtttctc aacatattag ccagttagaa 4320
 atgaataacg aggggcaata taacgtttgg gtatctaata cttcaatgaa cgaaaattat 4380
 tcctcaagtc aatatcgtcg ttttagttct aaaagtacgc aaactcaact tggttgggat 4440
 caaacaatct caaacaatgt tcagttaggt ggcgtgttta cttatgttcg caatagtaac 4500
 aactttgata aggcaagcag taaaaatact ctagcacaag ttaatttcta ttctaaatat 4560
 tatgctggata atcattggta tttgggcatt gatttaggct acggcaagtt ccaaagcaac 4620
 ctaaaaacca atcataatgc gaaatttgct cgccatactg cacaatttgg ttaaccgca 4680
 ggcaaagcat ttaatcttgg caattttggg attacgcaa tagtaggcgt gcgttatagc 4740
 tatttatcaa acgctaattt tgcattagct aaagatcgca ttaaagtaaa tccaatatct 4800
 gtcaaaacag cctttgctca agttgattta agttatactt atcacttagg cgagttttcc 4860
 gttacgcaa ttttgtctgc tcgatatgat acaaatcaag gcagcggaaa aattaatgta 4920
 aatcaatatg attttgctta caacgtggaa aaccaacagc aatataacgc agggcttaaa 4980
 ttgaaatatac ataatgtgaa attaagtcta ataggcggat taacaaaagc gaaacaagcg 5040
 gaaaaacaaa aaactgcaga attaaaacta agtttttagtt tttaa 5085

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de marcador de péptido heteróloga

10

<400> 6

His His His His His His
 1 5

<210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido que codifica la secuencia de marcador de péptido heteróloga
 <400> 7
 10 caccatcacc atcaccat 18
 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de marcador de péptido heteróloga
 20 <400> 8
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 1 5 10
 <210> 9
 25 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido que codifica la secuencia de marcador de péptido heteróloga
 <400> 9
 gagcaaaaagc tcatttctga agaggacttg 30
 35 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia de marcador de péptido heteróloga
 <400> 10
 Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 45 1 5
 <210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido que codifica la secuencia de marcador de péptido heteróloga
 55 <400> 11
 tacccttatg atgtgccaga ttatgcc 27
 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de marcador de péptido heteróloga
 <400> 12
 5
 Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 1 5 10

<210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10

<220>
 <223> Oligonucleótido que codifica la secuencia de marcador de péptido heteróloga
 <400> 13
 tatacagaca tagagatgaa cgcactgga aag 33
 15

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <223> Secuencia de marcador de péptido heteróloga
 <400> 14
 25

Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
 1 5 10

<210> 15
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30

<220>
 <223> Oligonucleótido que codifica la secuencia de marcador de péptido heteróloga
 <400> 15
 cagccagaac tcgccccgga agaccccgag gat 33
 35

<210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40

<220>
 <223> Secuencia de marcador de péptido heteróloga
 <400> 16
 45

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50

<220>
 <223> Oligonucleótido que codifica la secuencia de marcador de péptido heteróloga
 55

<220>
 <223> Oligonucleótido que codifica la secuencia de marcador de péptido heteróloga
 60

<400> 17
 ggcaaaccaa tcccaaacc actgctgggc ctggatagta ct 42

5 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de marcador de péptido heteróloga

<400> 18

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly .
 1 5

15 <210> 19
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido que codifica la secuencia de marcador de péptido heteróloga

25 <400> 19
 gattacaaag acgatgacga taaagga 27

<210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético para mutagénesis dirigida al sitio

35 <400> 20
 gatccgctta ccaattatgc 20
 <210> 21
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético para mutagénesis dirigida al sitio

45 <400> 21
 cttggtacgc taggcacgtg atgatgatga tgatgaggtg ttgtgatatt tgtcg 55

<210> 22
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético para mutagénesis dirigida al sitio

55 <400> 22
 cctaataata ttcaagctca cgtgcctagc gtac 34

60 <210> 23
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético para mutagénesis dirigida al sitio

<400> 23

5 ttcagcagaa gtctcttgc 19

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

10 <213> *Haemophilus influenzae*

<400> 24

Asn Asn Ile Gln Ala Asp

1

5

15

<210> 25

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Oligonucleótido que codifica la secuencia de marcador de péptido heteróloga

<400> 25

25 atcacaacac ctaataatat tcaagctgat gtccttagc 39

<210> 26

<211> 39

<212> ADN

30 <213> *Haemophilus influenzae*

<400> 26

atcacaacac ctcacatca tcacatcac gtccttagc 39

REIVINDICACIONES

- 5 1. IgA1 proteasa para su utilización en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la deposición de IgA1 en un paciente.
2. IgA1 proteasa según la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad es la nefropatía por IgA.
3. IgA1 proteasa según la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad es la dermatitis herpetiforme.
- 10 4. IgA1 proteasa según la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad es la púrpura de Henoch-Schoenlein.
5. IgA1 proteasa según la reivindicación 1, en la que la IgA1 proteasa se fusiona a un marcador.
- 15 6. IgA1 proteasa según la reivindicación 5, en la que el marcador se selecciona de entre el grupo constituido por c-Myc, HA, VSV-G, HSV, FLAG, V5 y HIS.
- 20 7. IgA1 proteasa según la reivindicación 1, en la que la IgA1 proteasa se selecciona de entre el grupo constituido por IgA1 proteasa de *Streptococcus pneumoniae*, IgA1 proteasa de *Streptococcus sanguis*, IgA1 proteasa de *Clostridium ramosum*, IgA1 proteasa de *Haemophilus influenzae*, IgA1 proteasa de *Neisseria meningitidis* e IgA1 proteasa de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 25 8. IgA1 proteasa según la reivindicación 7, en la que la IgA1 proteasa se selecciona de entre el grupo constituido por IgA1 proteasa de *Streptococcus sanguis*, IgA1 proteasa de *Clostridium ramosum*, IgA1 proteasa de *Haemophilus influenzae* e IgA1 proteasa de *Neisseria gonorrhoeae*.
- 30 9. IgA1 proteasa según la reivindicación 8, en la que la IgA1 proteasa es la IgA1 proteasa de *Haemophilus influenzae*.
10. IgA1 proteasa según la reivindicación 9, en la que la IgA1 proteasa de *Haemophilus influenzae* se selecciona de entre el grupo constituido por IgA1 proteasa de *Haemophilus influenzae* de tipo 1 e IgA1 proteasa de *Haemophilus influenzae* de tipo 2.
- 35 11. IgA1 proteasa según la reivindicación 8, en la que la IgA proteasa es la IgA1 proteasa de *Neisseria meningitidis*.
12. IgA1 proteasa según la reivindicación 11, en la que la IgA1 proteasa de *Neisseria meningitidis* se selecciona de entre el grupo constituido por IgA1 proteasa de *Neisseria meningitidis* de tipo 1 e IgA1 proteasa de *Neisseria meningitidis* de tipo 2.
- 40 13. IgA1 proteasa según la reivindicación 1, en la que la IgA1 proteasa escinde en la región bisagra de IgA1.
14. Utilización de una IgA1 proteasa para la preparación de un medicamento para su utilización en el tratamiento de nefropatía por IgA, dermatitis herpetiforme o púrpura de Henoch-Schoenlein.

FIGURA 2A

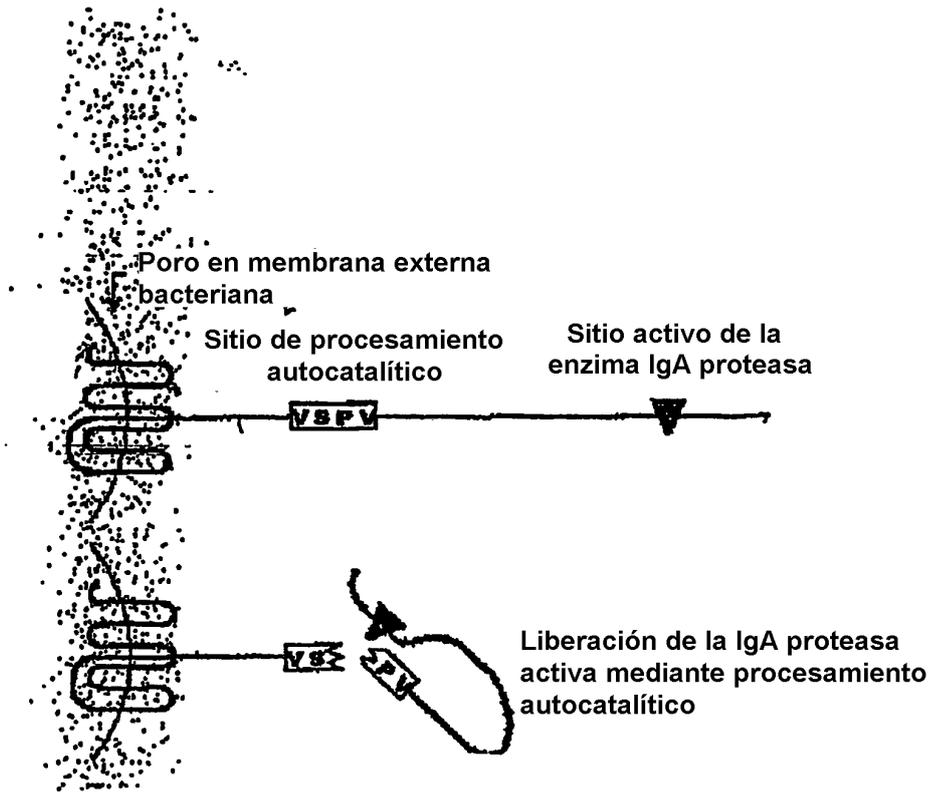


FIGURA 2B

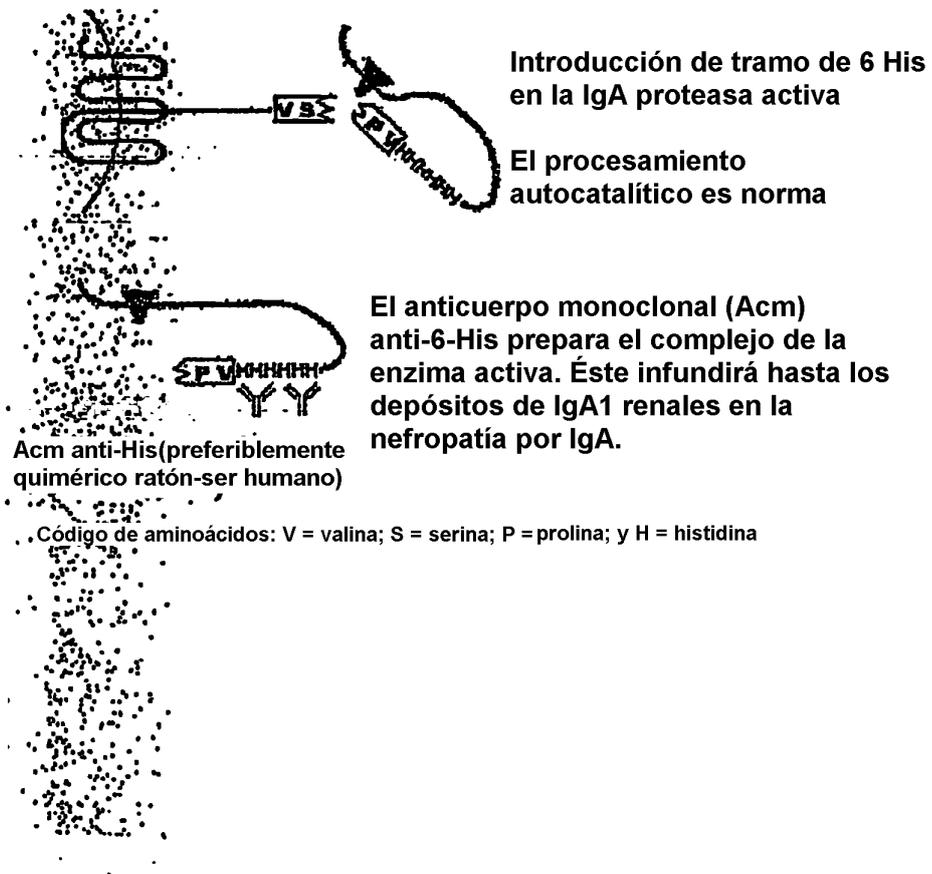


FIG. 3

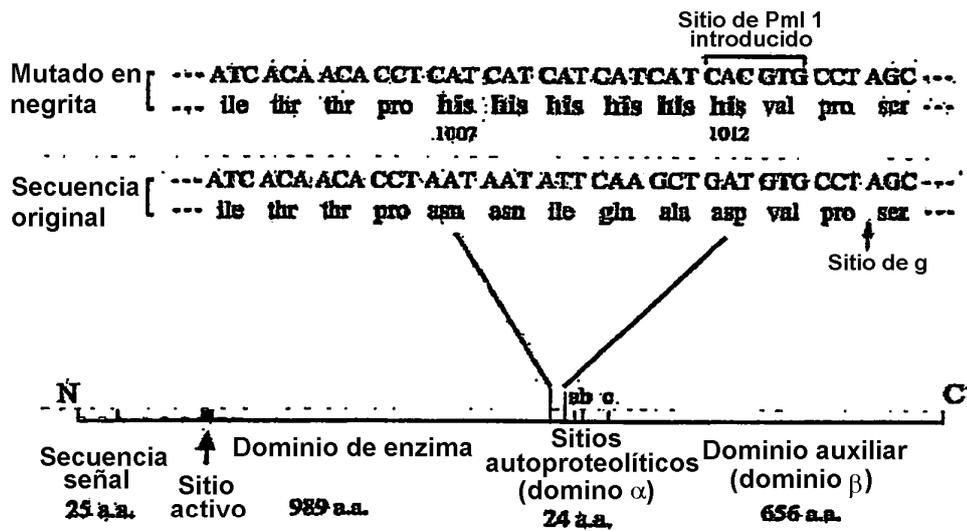


Diagrama esquemático que muestra el precursor de IgA proteasa de H. influenzae Rd que contiene 4 secciones: secuencia señal, dominio de enzima, dominio α y dominio "auxiliar" o β . El sitio activo de la proteasa está cerca del extremo N-terminal del dominio de enzima (flecha). En la parte superior del diagrama se muestran detalles de la mutación en la secuencia de proteína. El epítipo de 6xHis se encuentra alejado del sitio autocatalítico principal, el sitio a.

FIGURA 4

Diagrama esquemático de mutagénesis dirigida al sitio de 6 His del gen *iga* en la cepa Rd de *H. influenzae* en el plásmido pFG 26

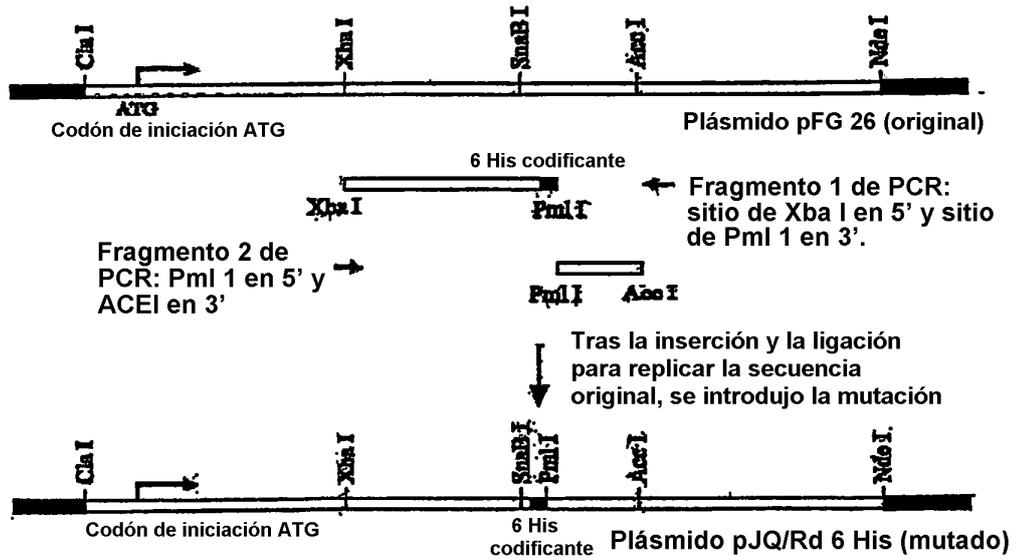


FIG. 5

Secuencia de proteína de Haemophilus influenzae Rd

MLNKKFKLNFIALTVAAYALTPYTEAALVRDDVDYQIFRDFAEKNGRFSVVGATNVEVRD
 KNNHSLGNVLPNGIPMIDFSVVDVDKRIATLINPQYVVGVKHVSNGVSELHFGNLNGN
 MNINGNAKSHRDVSSEENRYFSVEKNEYPTKLNKGAVTTEDQTQKRREDYMPRLDKF
 VTEVAPIEASTASSDAGTYNDQNKYPAFVRLGSGSQFTYKKGDNYSLILNNHEVGGNNL
 KLVGDAYTYGIAGTPYKVNHENGLIGFGNSKEEHSDPKGILSQDPLTNYAVLGDGSGSP
 LFVYDREKGGKWLFLGSYDFWAGYNKKSWEWNTYKPEFAKTVLDKDTAGSLTGSNTQ
 YNWNPTGKTSVISNGSESLNVDLFDSSQDTSKKNNHGKSVTLRSGGTLTLNNDIDQGA
 GGLFFEGDYEVKGTSDSTTWKAGVSVADGKTVTWKVHNPKSDRLAKIGKGTLIVEGK
 GENKGSLKVGDTVLKQQADANNKVKAFSQVGVSGRSTVVLNDDKQVDPNSIYFGF
 RGGRLDANGNNLTFEHIRNIDDGARLVNHNHNTSKTSTVTITGESLITDPNITTPYNIDAPDE
 DNPYAFRIKDGGLYLNLNENYTYALRKGASTRSELPKNSGESNENWLYMGKTSDEA
 KRNVNMNHINNERMNGFNGYFGBEEGKNNGNLNVTFKGGKSEQNRFLTGGTNLNGDLK
 VEKGTFLFSGRPTPHARDIAGISSTKKDQHF AENNEVVVEDDWINRNFKATNINVTNNA
 TLYSGRNVANITSNTASDNAKVHIGYKAGDTV CVRSDYTG YVTCTTDKLSDKALNSFN
 ATNVSGNVNLSGNANFVLGKANLFGTISGTGNSQVRLTENSHWHLTGDSNVNQLNLDK
 GHIHLNAQNDANKVTTYNTLTVNSLSGNGSFYYLTDLSNKQGDKVVVTKSATGNFTLQ
 YADKTGEPTKNELTLFDASNATRNNLNVSLVGNTVDLGAWKYKLRNVNGRYDLYNPE
 VEKRNQTVDTTNTTPNNIQADVPSVPSNNEELARYETPVPPPAPATPSETTETVAENSKQ
 ESKTVEKNEQDATETTAQNGEV AEEAKPSVKANTQTNBVAQSGSETEETQTTEIKETAK
 VEKEEKAKVEKDEIQEAPQMASETSPKQAKPAPKEVSTDTKVEETQVQAQPQTQSTTVA
 AAEATSPNSKPAEETQPSEKTNAEPVTPVVSKNQTENTTDQPTEREKTAKVETEKTQEP
 QVASQASPKQEQSETVQPQAVLESENVPTVNNAEEVQAQLQTQTSATVSTKQPAPENSI
 NTGSATAITETAESDKPQTETAASTEDASQHKANTVADNSVANNSSESSDPKSRRRRSIS
 QPQETSABETTAASTDETTIADNSKRSKPNRRSRRSVRSEPTVTNGSDRSTVALRDLTST
 NTNAVISDAMAKAQFVALNVGKA V SQHISQLEMNNEGQYNVWVSNTSMNENYSSSQY
 RRFSSKSTQTLGWDQTISNNVQLGGVFTYVRNSNFDKASSKNTLAQVNFYSKYYAD
 NHWYLGIDLGYGKFQSNLKTNHNKAFARHTAQFGLTAGKAFNLGNFGITPIVGVRYSY
 LSNANFALAKDRIKVNPIVKTAFQAQVDLSYTYHLGFEFSVTPILSARYDTNOGSGKINVN
 QYDFAYNVENQQQYNAGLKLKYHNVKLSLIGGLTKAKQAEKQKTAELKLSFSF"

FIGURA 6

Secuencia de nucleótido de Haemophilus influenzae Rd

atgctaaata aaaaattcaa actcaatfff attgcgctta ctgtcgccta cgcattaacc
 ccttatacag aagctgcggt agtgagagac gatgtggatt atcaaatatt tcgtgatttt
 gcagaaaata aaggagatt ttctgttggg.gcaacaaatg tggaaagtgag agataaaaaat
 aaccactctt taggcaatgt ttacctaaf ggcaaccga tgattgattt tagtgtgtg
 gatgtagata aacgcacgc cacattgata.aatccacaat atglagtagg tgtaaacac
 gttagtaacg gcgtgagtga actacatttt gggaactta atggcaatat gaataatggc
 'aatgctaaat cgcaccgaga tgtatctca gaagaaaata gatatttttc cgttgagaaa
 aatgagtac caactaaatt gaatggaaaa gcagtaacta ctgaagatca aactcaaaaa
 cgccgtgaag actactatat gccacgtctt gataaatttg ttaccgaagt tgcaccaata
 gaggcttcaa ctgcaagtag tgatgctggc acatataatg atcagaataa atatctgct
 tttgaagac taggaagtgg tagtcaattt attataaaa aaggagataa ttacagctta
 attttaaata atcatgaggt tggaggcaat aatcttaaat tgggtgggoga tgcctatacc
 tatggtattg caggcacacc ttataagta aaccacgaaa ataatggact aattggittt
 ggcaattcaa aagaggaaca cagcgatcca aaaggaatat.tatctcaaga tccgctfacc
 aattatgctg ttttagcga cagtggctcc ccattatttg tatatgatag agaaaaagga
 aatggcitt ttctgggtc ttatgatttt tgggcagggt ataacaaaa atcttgcaa
 gaatggaata ttataaacó tgaattgca aaaactgttc tagataaaga tactgcaggt
 /ctttaactg gtctaacac ccaatacaat tggaaatccta ctggcaaac aagcgttatt
 tctaattggt ctgaatctct aatgttgat ttattogata gtagtcagga tactgactct
 aagaagaaca atcacggaaa aagtgtgact cttagaggaa gtggaacgct.taccttaaat
 /aataatatcg atcaaggcgc aggcggcttg ttctttgaag gagattaiga agttaaggc

FIGURA 6 (continuación)

acttctgata gtaccacttg gaaaggagct ggcgtttctg ttgctgatgg aaaaacagta
 acgtggaaag tacataacco gaaatctgat cgttagcta aaatcggcaa aggaacatta
 attgtagaag gaaagggaga aaataaaggf tcgctaaaag tgggcgatgg tactgttacc
 ttaaaacaac aagctgatgc caataataaa gttaaagcct ttcacaagt aggtatagta
 agtggcgcct caactgtgt acttaatgat gataagcaag tagatccaaa ticcattac
 tttggctta gaggtggcgc attagatgcc aatggcaata atctcacttt tgaacatate
 cgtaatatig atgatggcgc aagactagta aatcacaata ccagcaaac ctctactgta
 acaattactg gggaaagtct aattacagat ccaaatataa ttactccata taatatagac
 gcaccagatg aagataatcc ttatgccttt cgacggatta aagatggagg acagctctat
 ttaaatttgg aaaattacac ttattatgcg ttaagaaaag gtgcgagcac tcgttcagaa
 ttacctaaaa atagtggcga aagcaatgaa aattggctat atatgggtaa aacttccgat
 gaagccaaaa gaaatgtaat gaaccatate aacaacgagc gtatgaatgg cttaacggf
 tattttggcg aggaagaaggg taaaaataac ggtaactaa atgtgacttt taaaggcaaa
 agtgagcaaa atcgcctttt attaacaggc ggaacaaacc ttaatggcga tttaaaggf
 gaaaaaggca cattattcct ttctggcaga ccaacaccgc acgcaagaga tattgcaggt
 atttcttoga caaaaaaga tcaacacttt gctgaaaata atgaagtggf agtagaagat
 gactggatta accgcaattt taaagcaaca aatattaatg taaccaataa cgcaaccctt
 tattcaggtc gcaatgttgc aaacattact tcaaatatca cagcttctga taatgcaaaa
 gtacatattg gctataaagc aggcgatacc gtttgtgtac gttctgacta tacgggctat
 gtgacttgca ctactgacaa gttatccgat aaagccctta atagctttaa cgccaccaat
 giatctggca atgtaaaftt atcaggtaat gcaaactttg tottaggcaa agctaactta
 tteggcacia ttagcggcac gggaaatagc caagtacgtt taaccgaaa tagccattgg
 cattaacag gcgatagcaa tgitaatcag ttaaatttag acaaggggca tattcattta
 aatgcacaaa acgatgcaaa taaagtaact acatataaca cgctgactgt gaatagetta
 tcaggtaacg gttcttcta ttatttaact gatctttcca ataaacaagg cgacaaagf

FIGURA 6 (continuación)

gttgtaacta aatccgccac aggtaacttt acattacaag tggcagataa aacaggcgag
 cctacaaaaa atgaactcac gcttttgat gogtcaaatg ctacaagaaa taattgaaat
 gtgtcattag ttgggaatac cgttgattta ggtgcttga aatataaatt acgtaatgtt
 aatggacgtt acgatttga taaccagag gtggaaaaaa gaaatcaaac tgtcgatacg
 acaaatatca caacacctaa taatattcaa gctgatgtgc ctagegtacc aagtaacaat
 gaagaaatag cccgtgtga aacaccagtt ccaccactg cgcctgtac accatcagag
 acaactgaaa cagtggtga aaatagtaag caagaaagta aaacagtaga gaaaaacgag
 caagacgcaa cagagacaac agctcaaaaat ggagaagttg cagaagaagc taaaccaagt
 gtaaaagcta atactcaaac aaatgaagtg gctcaaagtg gaagtgaac cgaggaaact
 caaacgactg aaataaaaga aacagctaaa gtagaaaaag aggaaaaggc taaagtagaa
 aaagatgaaa tcaagaagc acotcaaatg gcttctgaaa cgtctccgaa acaagcaag
 cctgctccta aagaagttc aactgatacg aaagtagaag aaactcaagt tcaagctcaa
 cogcaaacac aatcgacaac tgttctgctg gcagaggcaa cticgcaaaa cagtaacca
 gcggaagaaa ctcaaccaag tgaaaaaact aacgctgaac ctgtaacgcc tgtagtatca
 aaaaatcaaa cagaaatac gaccgacca ccaacagaaa gagagaaaac ggctaaagta
 gaaacagaga aaactcaaga acoocctcaa gtggcttctc aagcgtctcc gaaacaggaa
 cagtctgaaa ctgtcaacc gcaagcagtg cttgaaagtg aaaatgttcc gactgitaat
 aatgcagaag aagtcaagc tcaactgcaa acacaacaa gtgcaacagt aagcactaaa
 caacctgcac cagagaattc aataaatact ggatctgcaa ccgcaataac agaaactgct
 gaaaaatccg ataaaccaca aacggaaact gcggcttoga ctgaagatgc tagtcagcat
 aaagcgaata ctgttcgga taattctgta gcaataatt cagaaagcag tcatcacaag
 agtagacgta gaagaagtat tagccagcct caagagactt ctgctgaaga aacaacagca
 gcttctactg acgaaacaac aatagctgat aattcaaac gcagtaagcc aatcgtaga
 agtagaagaa gtgtcgtc ggaaccaact gttacaaatg gcagcagtcg ttctacagta
 gcattgcgcg atctacaag tacaacaca aatgcggtaa ttctgatgc aatggcaaaa

FIGURA 6 (continuación)

gcacaattg ttgcattaa tgtggggaaa gcagtttctc aacatattag ccagttagaa
 atgaataacg aggggcaata taacgtttgg gtatctaata cttcaatgaa cgaaaattat
 tcctcaagtc aatatcgtcg ttttagttct aaaagtacgc aaactcaact tggttgggat
 caaacaatct caaacaatgt ttagttaggt ggcgtgttla cttatgttcg caatagtaac
 aacttgata aggcaagcag taaaaaactc ctacacaaag ttaatttcta ttctaataat
 tatgctggata atcattggta ttggggcatt gatttaggct acggcaagtt ccaaagcaac
 ctaaaaacca atcataatgc gaaatttgcg cgcatactg cacaatttg ttaaccgca
 ggcaaagcat ttaatcttgg caattttggt attacgcaa tagtaggcgt gcgttatagc
 tatttatcaa acgctaattt tgcattagct aaagatcgca ttaaagtaaa tccaatatct
 gtcaaaacag cctttgtcga agttgattta agttatactt atcacttagg cgagttttcc
 gttacgcaa ttttgtctgc tcgatatgat acaaatcaag gcagcggaaa aattaatgta
 aatcaataig attttgcta caacgtggaa aaccaacagc aatataacgc agggcttaaa
 ttgaaatctc ataagttaa attaagtcta ataggcggat taacaaaagc gaaacaagcg
 gaaaaacaaa aaactgcaga attaaaacta agtttagtt ttaa