



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 964**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/525 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05723931 .1**

96 Fecha de presentación : **01.03.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1725659**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.11.2006**

54 Título: **Anticuerpos IgM naturales e inhibidores de los mismos.**

30 Prioridad: **01.03.2004 US 549123 P**
16.07.2004 US 588648 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.06.2011

73 Titular/es: **IMMUNE DISEASE INSTITUTE, Inc.**
800 Huntington Avenue
Boston, Massachusetts 02115, US
The President and Fellows of Harvard College y
The Brigham and Women's Hospital, Inc.

72 Inventor/es: **Carroll, Michael, C.;**
Moore, Jr., Francis, D. y
Hechtman, Herbert, B.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 360 964 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

Anticuerpos IgM naturales e inhibidores de los mismos.

Antecedentes de la invención

5 Las células nucleadas son muy sensibles a la hipoxia e incluso cortos períodos de isquemia en organismos multicelulares pueden tener drásticos efectos sobre la morfología celular, la transcripción de los genes y los procesos enzimáticos. Las mitocondrias, como lugares principales del metabolismo con oxígeno, son particularmente sensibles a cambios en las concentraciones de oxígeno y durante la hipoxia liberan especies reactivas con el oxígeno que modifican químicamente los constituyentes celulares tales como los lípidos y las proteínas. Clínicamente, estos efectos se manifiestan en el paciente como una respuesta inflamatoria. A pesar de las intensas investigaciones sobre las respuestas celulares a la hipoxia, poco se sabe con respecto al inicio de la inflamación aguda.

10 Las respuestas inflamatorias agudas pueden proceder de una amplia gama de enfermedades y sucesos que se producen de manera natural tales como la apoplejía y el infarto de miocardio. Los procedimientos médicos comunes también pueden conducir a una inflamación localizada y sistémica. La inflamación que se deja sin tratar puede dar lugar a una pérdida significativa de tejido y finalmente puede conducir a un fallo multisistémico y a la muerte. Interferir con la respuesta inflamatoria después de una lesión puede ser un método para reducir la pérdida de tejido.

15 Las enfermedades inflamatorias y las enfermedades inflamatorias agudas que proceden de lesiones en los tejidos no pueden, sin embargo, ser explicadas por sucesos celulares solitarios. La evidencia acumulada soporta que la respuesta innata del suero o la del sistema del complemento tienen un papel principal en la inflamación. Los estudios realizados hasta la fecha han mirado la lesión resultante de la isquemia y la reperfusión como un tipo de trastorno inflamatorio que depende del complemento. Por ejemplo, en el modelo de lesión por reperfusión del miocardio en ratas, el pretratamiento de las ratas con una forma soluble del receptor tipo 1 del complemento reduce drásticamente la lesión. Comprender cómo la activación del complemento contribuye a una respuesta inflamatoria es un área de investigación activa.

20 Las enfermedades o trastornos inflamatorios son potencialmente una amenaza para la vida, costosos y afectan a un gran número de gente cada año. Así, se necesitan tratamientos efectivos de las enfermedades o trastornos inflamatorios.

Sumario de la invención

25 En un aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un péptido el cual consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36 ó 38.

30 El ácido nucleico aislado puede codificar un péptido el cual consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36 ó 38, y puede tener la secuencia de SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 35 ó 37.

El ácido nucleico aislado de la invención puede estar operablemente conectado a un promotor.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en:

a) Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos la cual es al menos 96% idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 11;

b) Una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 11;

40 c) Una molécula de ácido nucleico que se hibrida con el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 ó SEQ ID NO: 7 en condiciones rigurosas;

d) Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 ó SEQ ID NO: 12.

45 La invención también proporciona un vector que comprende el ácido nucleico de la invención, así como una célula huésped aislada que comprende tal vector.

También se proporciona una composición que comprende un péptido el cual consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36 ó 38. El péptido puede consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36 ó 38.

En la composición de la invención, el péptido puede estar pegilado o marcado con un marcador detectable.

La invención también proporciona una composición de la invención o que comprende un péptido el cual tiene la secuencia de aminoácidos que de SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36 ó 38, para tratar una enfermedad o trastorno inflamatorio en un sujeto.

- 5 La enfermedad o trastorno inflamatorio puede ser una lesión por reperfusión, y el sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano.

También se proporciona el uso de una composición de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno inflamatorio en un sujeto.

- 10 La invención también proporciona un polipéptido asilado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 ó SEQ ID NO: 12, así como una inmunoglobulina natural aislada la cual es producida por una célula que tiene el número de depósito ATCC PTA-3507.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes sobre la base de la siguiente "Descripción detallada" y de las "Reivindicaciones".

Breve descripción de las figuras

- 15 La figura 1 muestra una secuencia de las cadenas pesadas de IgM del hibridoma 22A5 de células B-1. (A) Muestra la secuencia (SEQ ID NO: 1) de ácido nucleico de las cadenas pesadas de IgM^{CM-22} (o IgM 22A5) y (B) muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) que corresponde a la secuencia de SEQ ID NO: 1 de las cadenas pesadas. Las regiones marco (FVWR) y las regiones que determinan la complementariedad (CDR) están indicadas por encima de los nucleótidos.

- 20 La figura 2 muestra una secuencia de las cadenas ligeras de IgM del hibridoma 22A5 de células B-1. (A) Muestra la secuencia (SEQ ID NO: 7) de ácido nucleico de las cadenas ligeras de IgM^{CM-22} (o IgM 22A5) y (B) muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) que corresponde a la secuencia de SEQ ID NO: 7 de las cadenas ligeras. Las regiones marco (FVWR) y las regiones que determinan la complementariedad (CDR) están indicadas por encima de los nucleótidos.

- 25 La figura 3 es un gráfico de barras que muestra los cambios en la permeabilidad intestinal de ratones consanguíneos después de la isquemia intestinal y de la reperfusión o de ninguna lesión (falso, simulado). WT representa el linaje parental de ratones Cr2^{-/-}. Cr2^{-/-} fue reconstituido con IgG o IgM o disolución salina testigo combinadas. IgM o IgG (0,5 mg) combinadas se administraron intravenosamente aproximadamente 1 hora antes del tratamiento. Los valores son medias ± error estándar, n es igual al número de ratones en los grupos experimentales.

- 30 La figura 4 demuestra la reconstitución de lesión I/R en ratones deficientes en anticuerpos (RAG-1) mediante IgM combinada A partir de un único clon de hibridoma de células B-1. Se inyectó intravenosamente IgM o disolución salina 30 minutos antes de la laparotomía inicial. Al final de la reperfusión, se obtiene sangre y se calcula el índice de permeabilidad como la relación de cuentas de ¹²⁵I del intestino seco frente a las de la sangre. Los valores representan medias ± error estándar, n es igual al número de ratones usados en los grupos experimentales. 1 = WT más disolución salina normal; 2 = RAG más disolución salina normal; 3 = RAG más hibridoma CM-22 IgM; 4 = Testigo WT simulado.

- 35 La figura 5 es un diagrama esquemático del papel propuesto para el complemento y los receptores del complemento en la selección positiva de linfocitos peritoneales B-1.

La figura 6A es un gráfico que muestra la selección ELISA de la biblioteca que muestra el fago M-13 para péptidos específicos de IgM^{CM-22}. Símbolos: □ - clon P-1; X - clon P2; ○ - clon P7; ◇ - clon P8.

- 40 La placa se revistió con una disolución de IgM^{CM-22} antes de la adición de concentraciones variables de clones de fago. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

- 45 La figura 6B es un gráfico que muestra que el péptido sintético P8 inhibe la unión del clon P8 del fago a IgM^{CM-22}. El ensayo ELISA se realizó añadiendo concentraciones variables del péptido sintético P8 a la placa revestida con IgM^{CM-22} antes de la adición de 5 x 10¹¹ PFU de fago. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

La figura 6C es un gráfico que muestra la unión específica del péptido P8 a IgM^{CM-22}. Las placas ELISA se revistieron con una disolución 50 µg/mL de péptido P8, seguido por la adición de IgM^{CM-22} o IgM^{CM-75} en una concentración de 1 ó 10 µg/mL. La unión a IgM se detectó con una IgM biotinilada anti-ratón de rata seguida por estreptavidina-fosfatasa y reacción con generación de color. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

- 50 La figura 7A es una serie de fotomicrografías que muestran que la IgM^{CM-22} bloqueada con el péptido P8 medió la lesión *in vivo*. Los dos paneles superiores (i y ii) son secciones representativas (teñidas con hematoxilina y eosina) preparadas

siguiendo un tratamiento RI en ratones RAG-1^{-/-} con IgM^{CM-22} sola o mezclada con el péptido P8, respectivamente. Los dos paneles inferiores (iii y iv) son secciones representativas preparadas a partir de ratones silvestres tratados contra la lesión intestinal por reperfusión, los cuales recibieron bien disolución salina o bien péptido P8 5 minutos antes de la reperfusión. Las flechas indican las características patológicas de la lesión. Aumento 200x.

5 La figura 7B es una representación gráfica de dispersión que indica la puntuación media de la patología de cada grupo de animales tratados. Cada símbolo representa la puntuación de un animal. El grupo testigo está formado por ratones WT pretratados con un péptido testigo (ACGMPYVRIPTA; SEQ ID NO: 61) a una dosis similar que el péptido P8. * Indica la significancia estadística determinada por el test t de Student de los grupos tratados con P8 frente a los grupos no tratados ($p < 0,05$).

10 La figura 7C es una serie de fotomicrografías que muestran la ausencia de IgM y de complemento C3 ó C4 dentro de las microvellosidades de animales tratados con P8. Se cosecharon criosecciones representativas de tejidos intestinales después de RI intestinal. Los paneles i-viii son ratones RAG-1^{-/-} reconstituidos con IgM^{CM-22} sin pretratamiento con P8 (paneles i-iv) o con P8 (paneles v-viii). Los paneles representan criosecciones de los intestinos de WT sin P8 (paneles ix-xii) o pretratados con P8 (paneles xiii-xvi). Las secciones (i, iii, v, vii, ix, xiii, xv) se tiñeron con anti-IgM-biotina seguido por estreptavidina-Alexa-568 (rojo) y se contratiñeron con DAPI (violeta). Los paneles (ii, x, xiv) se tiñeron con anti-C4-Alexa 488/FITC (verde) y los paneles (iv, viii, xii, xvi) se tiñeron con anti-C3-FITC (verde). Aumento 400x.

15 La figura 8A es un ensayo de inmunotransferencia que muestra la inmunoprecipitación de antígenos específicos de la lesión por reperfusión (RI). Detección de una única banda (flecha) a aproximadamente 250 kDa en una electroforesis SDS-PAGE (10%). Los marcadores de tamaño se indican a la izquierda. Se prepararon lisados de ratones RAG-1^{-/-} reconstituidos con IgM^{CM-22} y bien un testigo simulado (sin isquemia) o bien sometido a isquemia seguido por reperfusión durante 0 a 15 min.

20 La figura 8B es una serie de gráficos que muestran los resultados de ensayos de enlace *in vitro* de IgM^{CM-22} a los isomorfos de la cadena pesada II de miosina no muscular (NMHC-II). Se revisieron placas para ensayo ELISA con anticuerpos monoclonales para 3 diferentes isomorfos de NMHC-II (parte superior izquierda: isomorfo A, parte superior derecha: isomorfo B, parte inferior izquierda: isomorfo C y parte inferior derecha: anticuerpo anti-pan miosina). La cadena pesada de la miosina unida de lisados intestinales se detectó mediante IgM^{CM-22} o IgM^{CM-31}. Los resultados representan la media \pm error estándar de unidades OD (densidad óptica) a 405 nm y son representativos de muestras por triplicado.

25 La figura 8C es una fotomicrografía y una representación gráfica de dispersión que muestra la restauración de la lesión RI mediante un anticuerpo anti-pan miosina en ratones RAG-1^{-/-}. Los ratones RAG-1^{-/-} fueron reconstituidos con anti-pan miosina purificada por afinidad seguido por cirugía RI. Los paneles de la izquierda representan morfologías de animales RAG-1^{-/-} con disolución salina como testigo y con tratamiento anti-pan miosina. El panel de la derecha es el de las puntuaciones de la patología de la lesión intestinal. La representación gráfica de dispersión (panel derecha) representa las puntuaciones de la patología en el que cada símbolo representa a un único animal.

30 La figura 9A es un gráfico que muestra la resonancia de plasmones superficiales del auto-péptido N2. Isotermas de unión para muestras del auto-péptido N2 inyectando una concentración de 10,5 μ M a 120 μ M sobre la superficie acoplada a IgM^{CM-22}.

35 La figura 9B es un gráfico que muestra la resonancia de plasmones superficiales de un péptido testigo. Isotermas de unión para un péptido testigo de secuencia al azar de la misma longitud (AGCMPYVRIPTA; SEQ ID NO: 62) inyectado a una concentración de 117 μ M sobre la superficie acoplada a IgM^{CM-22}.

La figura 9C es un gráfico que muestra el ajuste no lineal de la curva con una isoterma de unión 1:1 tipo Langmuir a las valores respuesta en estado estacionario para la inyección mostrada en la figura 9A ($\chi^2 = 10$).

La figura 9D es un gráfico que muestra la isoterma de unión para la inyección del auto-péptido N2 en una concentración de 120 μ M sobre la superficie acoplada con la IgM^{CM-31} testigo.

40 La figura 10A es una serie de fotomicrografías que muestran que el auto-péptido bloquea la RI en ratones RAG-1^{-/-}. Los dos paneles superiores muestran secciones representativas preparadas tras el tratamiento RI en ratones RAG-1^{-/-} con IgM^{CM-22} sola o mezclada con auto-péptido N2. Los dos paneles inferiores son secciones representativas preparadas a partir de ratones WT tratados contra la RI intestinal, los cuales recibieron o bien disolución salina o bien péptido N2 5 minutos antes de la reperfusión.

45 La figura 10B es una representación gráfica de dispersión que indica la puntuación media de la patología de cada grupo de animales tratados. Cada símbolo representa a un único ratón. * Indica una significancia estadística basada en un ensayo t de Student.

50 La figura 10C es una serie de fotomicrografías que muestran la prevención mediante el auto-péptido N2 de la activación de la ruta clásica del complemento en RI intestinal. Se cosecharon criosecciones representativas de tejidos intestinales tras RI intestinal y se trataron con un anticuerpo específico para IgM, C4 ó C3 de ratón (aumento 400x). Los ratones RAG-1^{-/-} reconstituidos con IgM^{CM-22} sin pretratamiento con el auto-péptido N2 están en los paneles i-iv o con el auto-

5 péptido N2 están en los paneles v-viii. Los ratones silvestres sin pretratamiento con el auto-péptido N2 están en los paneles ix-xii o con pretratamiento con el auto-péptido N2 están en los paneles xiii-xvi. Los tejidos de los paneles i, iii, v, vii, ix, xiii, xi, xv se tiñeron con anti-IgM-biotina seguido por estreptavidina-Alexa-568 (rojo) y se contratiñeron con DAPI (violeta). Los paneles ii, vi, x y xiv se tiñeron con anti-C4-FITC (verde). Los paneles iv, viii, xii y xvi se tiñeron con anti-C3-FITC (verde).

La figura 11 muestra (A) la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 47; nº de acceso al Genbank NM_022410) y (B) la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 48; nº de acceso al Genbank NP_071855) de la cadena pesada II-A de la miosina no muscular de ratón (mNMHC-IIA).

10 La figura 12 muestra (A) la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 49; nº de acceso al Genbank NM_002473) y (B) la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 50; nº de acceso al Genbank NP_002464) de la cadena pesada II-A de la miosina no muscular de ser humano (hNMHC-IIA).

La figura 13 muestra (A) la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 51; nº de acceso al Genbank NM_175260) y (B) la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 52; nº de acceso al Genbank NP_780469) de la cadena pesada II-B de la miosina no muscular de ratón (mNMHC-IIB).

15 La figura 14 muestra (A) la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 53; nº de acceso al Genbank NM_005964) y (B) la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 54; nº de acceso al Genbank NP_005955) de la cadena pesada II-B de la miosina no muscular de ser humano (hNMHC-IIB).

20 La figura 15 muestra (A) la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 55; nº de acceso al Genbank AY363100) y (B) la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 56; nº de acceso al Genbank AAQ24173) de la cadena pesada II-C de la miosina no muscular de ratón (mNMHC-IIC).

La figura 16 muestra (A) la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 59; nº de acceso al Genbank NM_024729) y (B) la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 60; nº de acceso al Genbank NP_079005) de la cadena pesada II-C de la miosina no muscular de ser humano (hNMHC-IIC).

Descripción detallada

25 6.1. Definiciones

Por conveniencia, se proporcionan ciertos términos y expresiones empleadas en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos y expresiones técnicas y científicas usadas en la presente memoria tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

30 En la presente memoria “un(a)” se usan para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” quiere decir un elemento o más de un elemento.

En la presente memoria, “aminoácido” se usa para referirse a aminoácidos naturales o sintéticos, incluyendo glicina y los isómeros ópticos D y L, y a análogos de aminoácidos y compuestos que mimetizan a los péptidos.

35 En la presente memoria, “anticuerpo” se usa para referirse a moléculas de unión que incluyen moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígenos. Las moléculas de inmunoglobulinas útiles en la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase. Los anticuerpos y las inmunoglobulinas naturales son usualmente glicoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo y un dominio constante en su otro extremo. Los anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, quimera, parcial o completamente humanizados (es decir, generados en un ratón transgénico que expresa genes de inmunoglobulinas de ser humano), anticuerpos de camello y anticuerpos anti-idiotípicos. Un anticuerpo, o generalmente cualquier molécula, “se une específicamente” a un antígeno (u otra molécula) si el anticuerpo se une preferencialmente al antígeno, y, por ejemplo, tiene menos que aproximadamente 30%, preferiblemente 20%, 10% ó 1% de reactividad cruzada con otra molécula. Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” se usan intercambiamente.

40 En la presente memoria “fragmento de anticuerpo” o “porción de anticuerpo” se usan para referirse a cualquier derivado de un anticuerpo cuya longitud es menor que la total. En las realizaciones ejemplos, el fragmento de anticuerpo retiene al menos una porción significativa de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, diacuerpo dsFv, minicuerpo, fragmentos Fd y anticuerpos de una única cadena. El fragmento de anticuerpo puede producirse mediante cualquier medio. Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo puede producirse enzimática o químicamente por fragmentación de un anticuerpo intacto, puede producirse por recombinación a partir de un gen que codifica la secuencia parcial del anticuerpo o puede producirse total o parcialmente sintéticamente. El fragmento de anticuerpo puede ser opcionalmente un fragmento de anticuerpo de una única cadena. Alternativamente, el fragmento puede comprender múltiples cadenas

que están unidas conjuntamente mediante, por ejemplo, puentes disulfuro. El fragmento puede también opcionalmente ser un complejo multimolecular. Un fragmento de anticuerpo funcional comprenderá típicamente al menos aproximadamente 50 aminoácidos y más típicamente comprenderá al menos aproximadamente 200 aminoácidos.

5 En la presente memoria, "sitio de unión al antígeno" se usa para referirse al dominio variable de una cadena pesada asociada con el dominio variable de una cadena ligera.

En la presente memoria, "unión" o "de unión" se usa para referirse a relaciones o asociaciones (por ejemplo, interacciones bioquímicas) detectables entre moléculas.

10 En la presente memoria, "células", "células huésped" o "células huésped recombinantes" se usan intercambiamente, se entiende que tales términos no sólo se refieren a la célula objeto particular sino a la progenie o potencial progenie de tal célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en la generaciones sucesivas debido a mutación o a influencias medioambientales, tal progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula madre, pero aún están incluidas dentro del alcance de la expresión como se usa en la presente memoria.

"Comprendidos" y "que comprenden" se usan en el sentido inclusivo y abierto que quiere decir que pueden incluirse elementos adicionales.

15 En la presente memoria, "secuencia consenso" se usa para referirse a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que se encuentran más frecuentemente en una familia de secuencias relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones, 1987). En una familia de proteínas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que se encuentra más frecuentemente en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos se encuentran con la misma frecuencia, ambos pueden estar incluidos en la secuencia consenso. Un "marco consenso" se refiere a la región marco en la secuencia consenso de la inmunoglobulina.

20 Una "sustitución conservadora de un aminoácido" es una en la cual el residuo aminoácido es reemplazado por un residuo aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en la posición beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un residuo aminoácido no esencial predicho en una inmunoglobulina natural puede preferiblemente ser reemplazado con otro residuo aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Alternativamente, en otra realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o en parte de una secuencia que codifica a una inmunoglobulina natural, tal como por mutagénesis de saturación, y puede seleccionarse la actividad biológica de los mutantes resultantes.

25 En la presente memoria, "marcador detectable" se usa para referirse a una molécula capaz de detección, incluyendo, pero no limitándose a, isótopos radioactivos, fluoróforos, restos quimioluminiscentes, enzimas, sustratos de enzimas, cofactores de enzimas, agentes inhibidores de enzimas, colorantes, iones metálicos, ligandos (por ejemplo, biotina o haptenos) y semejantes. "Fluoróforo" se refiere a una sustancia o una porción de la misma que es capaz de exhibir fluorescencia en el intervalo detectable. Ejemplos particulares de marcadores que pueden usarse en la invención incluyen fluoresceína, rodamina, dansilo, umbeliferona, rojo de Tejas, luminol, NADPH, beta-galactosidasa y peroxidasa de rábano.

30 En la presente memoria, "agente inhibidor" o "agente inhibidor de IgM" o "antagonista" se usa para referirse a un agente que reduce o bloquea (completa o parcialmente) una interacción entre un anticuerpo natural y otra molécula implicada en una cascada inflamatoria. Un agente inhibidor puede antagonizar una o más de las siguientes actividades de una IgM natural: (i) inhibir o reducir una interacción (por ejemplo, la de unión) entre la IgM y un antígeno específico de la isquemia; (ii) inhibir o reducir una interacción (por ejemplo, la de unión) entre la IgM natural y un componente de la ruta del complemento, por ejemplo, C1q; (iii) neutralizar a la IgM natural mediante, por ejemplo, el secuestro de la inmunoglobulina y/o dirigiendo su degradación; o (iv) inhibir o reducir la producción de la IgM natural, por ejemplo bloquea la síntesis, ensamblaje y/o las modificaciones postranslacionales de la IgM. El agente inhibidor puede ser una proteína o un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo (por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotípico), un anticuerpo modificado, un carbohidrato, una glicoproteína o una pequeña molécula orgánica.

35 "Interacción" se refiere a una asociación física entre dos o más moléculas, por ejemplo, un enlace. La interacción puede ser directa o indirecta.

40 En la presente memoria, "enfermedad inflamatoria" se usa para referirse a una enfermedad o trastorno que es provocado, o contribuye a su provocación, por una complicada serie de ajustes funcionales o celulares que implican cambios agudos o crónicos en la microcirculación, el movimiento de los fluidos y la afluencia y activación de células inflamatorias (por ejemplo, leucocitos) y el complemento, e incluye enfermedades autoinmunes. Ejemplos de tales enfermedades y afecciones incluyen, pero no se limitan a: lesión por reperusión, lesión por isquemia, apoplejía, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, artritis reumatoide, enfermedad celíaca, inmunodeficiencia

5 hiper-IgM, arteriosclerosis, enfermedad de las arterias coronarias, sepsis, miocarditis, encefalitis, rechazo a los
 10 transplantes, hepatitis, tiroiditis (por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves), osteoporosis, polimiositis,
 dermatomiositis, diabetes tipo I, gota, dermatitis, alopecia areata, lupus sistémico eritematoso, liquen escleroso, colitis
 ulcerosa, retinopatía diabética, enfermedad pélvica inflamatoria, enfermedad periodontal, artritis, artritis juvenil crónica
 (por ejemplo, iridociclitis crónica), psoriasis, osteoporosis, nefropatía en diabetes mellitus, enfermedad pélvica
 inflamatoria, enfermedad inflamatoria crónica del hígado, enfermedad inflamatoria crónica del pulmón, fibrosis pulmonar,
 fibrosis hepática, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria crónica del hígado, enfermedad inflamatoria crónica del
 pulmón, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, quemaduras, y otras enfermedades
 inflamatorias agudas y crónicas del sistema nervioso central (SNC; por ejemplo, esclerosis múltiple), el sistema
 gastrointestinal, la piel y estructuras asociadas, el sistema inmune, el sistema hepato-biliar o cualquier sitio del cuerpo
 en el que pueda ocurrir una patología con un componente inflamatorio.

Una molécula "aislada", por ejemplo una IgM aislada, se refiere al estado de estar separada o purificada de otras
 moléculas presentes en el entorno natural.

15 En la presente memoria, "IgM natural" se usa para referirse a un anticuerpo tipo IgM que se produce de manera natural
 en un mamífero (por ejemplo, un ser humano). Tienen una estructura pentámera de anillos en la que los monómeros
 individuales se parecen a IgGs mediante lo cual tienen dos cadenas ligeras (κ o λ) y dos cadenas pesadas (μ). Además,
 las cadenas pesadas contienen un dominio adicional C_H4. Los monómeros forman un pentámero mediante puentes
 20 disulfuro entre cadenas pesadas adyacentes. El anillo pentámero está cerrado mediante los puentes disulfuro entre una
 cadena J y dos cadenas pesadas. Debido a su alto número de sitios de enlace al antígeno, un anticuerpo IgM natural es
 un aglutinante efectivo del antígeno. La producción de anticuerpos IgM naturales en un sujeto es importante en la
 activación inicial de células B, macrófagos y el sistema del complemento. IgM es la primera inmunoglobulina sintetizada
 en una respuesta de anticuerpos.

25 En la presente memoria, "ácido nucleico" se usa para referirse a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico
 (DNA) y, cuando es apropiado, a ácido ribonucleico (RNA). Debe entenderse que la expresión también incluye, como
 equivalentes, análogos tanto de RNA como de DNA fabricados a partir de análogos nucleótidos, y, aplicable a la
 realización que se describe, polinucleótidos de doble y única hebra (sentido o antisentido).

30 En la presente memoria, "operativamente conectado" se usa para referirse a una yuxtaposición en la que los
 componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera pretendida. Por ejemplo, una
 secuencia codificante está "operablemente conectada" a otra secuencia codificante cuando la RNA polimerasa
 transcribe las dos secuencias codificantes en un único mRNA, el cual se traduce a continuación en un único polipéptido
 que tiene aminoácidos derivados de ambas secuencias codificantes. Las secuencias codificantes no necesitan ser
 35 contiguas una con otra en tanto y cuanto las secuencias expresadas produzcan finalmente la proteína deseada. Una
 secuencia de control de expresión operativamente conectada a una secuencia codificante está ligada tal que la
 expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control de
 expresión. En la presente memoria, "secuencias de control de expresión" se usa para referirse a secuencias de ácido
 nucleico que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico a la que están operativamente conectadas. Las
 secuencias de control de expresión están operativamente conectadas a un ácido nucleico cuando las secuencias de
 control de expresión controlan y regulan la transcripción, y, cuando es apropiado, la traducción de la secuencia de ácido
 40 nucleico. Por tanto, las secuencias de control de expresión pueden incluir promotores apropiados, potenciadores,
 agentes de terminación de la transcripción, un codón de inicio (es decir, ATG) en frente de un gen que codifica una
 proteína, señales de empalme de intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la
 traducción apropiada del mRNA, y codones de parada. Se pretende que la expresión "secuencias de control" incluya,
 como mínimo, componentes cuya presencia pueda influir en la expresión, y también puede incluir componentes
 45 adicionales cuya presencia sea ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de fusión de socios. Las
 secuencias de control de expresión pueden incluir un promotor.

En la presente memoria, "paciente", "sujeto" o "huésped" se usan para referirse a un mamífero humano o no humano.

50 En la presente memoria, "péptido" se usa para referirse a un polímero de aminoácidos de longitud relativamente corta
 (por ejemplo, menos que 50 aminoácidos). El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos
 modificados y puede estar interrumpida por compuestos que no son aminoácidos. El término también abarca un
 polímero de aminoácidos que ha sido modificado; por ejemplo, formación de puentes disulfuro, glicosilación, lipidación,
 acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación, tal como conjugación con un componente marcador.

55 En la presente memoria, "promotor" se usa para referirse a una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción.
 También están incluidos en la invención aquellos elementos promotores que son suficientes para volver controlable la
 expresión de los genes dependiente de promotores por elementos reguladores específicos del tipo de células,
 específicos de tejidos, o inducible por señales o agentes externos; tales elementos pueden estar localizados en las
 regiones 5' ó 3' de una secuencia de polinucleótido. Tanto los promotores constituyentes como los inducibles están
 incluidos en la invención (véase, por ejemplo, Bitter et al., *Methods in Enzymology* 153: 516-544, 1987). Por ejemplo,
 cuando se clonan en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como pL de bacteriófago, plac,
 ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y semejantes. Cuando se clonan en sistemas celulares de mamíferos, pueden

5 usarse promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, el promotor metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, la repetición terminal larga de retrovirus; el promotor tardío de adenovirus, el promotor de 7,5K del virus vacuna). También pueden usarse promotores producidos por DNA recombinante o técnicas sintéticas para proporcionar la transcripción de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención. Pueden usarse elementos reguladores específicos de los tejidos. Están incluidos, por ejemplo, elementos reguladores de genes o virus que son diferencialmente expresados en diferentes tejidos.

10 En la presente memoria, “específicamente se une” se usa para referirse a la interacción entre dos moléculas para formar un complejo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. En la presente memoria, la expresión se usa en referencia a varias moléculas, que incluyen, por ejemplo, la interacción de un anticuerpo y un antígeno (por ejemplo, un péptido). La unión específica puede caracterizarse por una constante de disociación de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M, en general al menos aproximadamente 1×10^{-7} M, usualmente al menos aproximadamente 1×10^{-8} M, y particularmente al menos aproximadamente 1×10^{-9} M ó 1×10^{-10} M o mayor. Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmones superficiales y métodos semejantes.

15 En la presente memoria, “hibridación en condiciones rigurosas” o “hibrida en condiciones poco rigurosas, de rigurosidad media, de alta rigurosidad o muy rigurosas” se usa para describir condiciones de hibridación y lavado. Una guía para realizar reacciones de hibridación puede encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, que se incorpora por referencia. En esa referencia se describen métodos acuosos y no acuosos y pueden usarse ambos. Las condiciones de hibridación específica referidas en la presente memoria son como sigue: 1) condiciones de hibridación poco rigurosas en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6X a aproximadamente 45°C, seguido por dos lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1% al menos a 50°C (la temperatura de los lavados puede aumentarse a 55°C para condiciones poco rigurosas); 2) condiciones de hibridación de rigurosidad media en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1% a 60°C; 3) condiciones de hibridación rigurosas en SSC a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1% a 25 65°C; y preferiblemente 4) condiciones de hibridación muy rigurosas son fosfato de sodio 0,5M, SDS al 7% a 65°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1% a 65°C. Las condiciones muy rigurosas (4) son las condiciones preferidas y las que deben usarse a menos que se especifique otra cosa. Los cálculos de homología o identidad de secuencias entre secuencias (las expresiones se usan intercambiamente) se realizan como sigue. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o en ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para un alineamiento óptimo y con fines comparativos pueden ignorarse las secuencias no homólogas). En una realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines comparativos es al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, 60% e incluso más preferiblemente al menos 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. A continuación, se comparan los residuos aminoácidos o los nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o de nucleótidos. Cuando una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo aminoácido o nucleótido que la correspondiente posición de la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición.

40 El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias y el porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones conservadas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se necesitan introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad y/u homología entre dos secuencias puede conseguirse usando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch ((1970) *J. Mol. Biol.* 48: 444-453) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete informático GCG (disponible en la web con la extensión gcg.com) usando una matriz Blossum 62 o una PAM250, y un peso de huecos de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En aún otra realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete informático GCG (disponible en la web con la extensión gcg.com) usando una matriz NWSgapdna CMP y un peso de huecos de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. Una serie de parámetros particularmente preferidos (y el que debe usarse a menos que se especifique otra cosa) son una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por huecos de 12, una penalización por la extensión de huecos de 4 y una penalización por huecos en el marco de lectura de 5.

55 El porcentaje de identidad y/u homología entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller ((1989) *CABIOS*, 4: 11-17) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla PAM120 de peso de residuos, una penalización por longitud de huecos de 12 y una penalización por huecos de 4.

60 En la presente memoria, “tratar” se usa para referirse a cualquier tratamiento de, o prevención de, o inhibición de un trastorno o enfermedad en un sujeto e incluye a modo de ejemplo: (a) prevenir que ocurra la enfermedad o trastorno en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o trastorno, pero al que todavía no se le ha diagnosticado que lo tiene; (b) inhibir la enfermedad o trastorno, es decir parar su progresión; o (c) aliviar o mejorar la enfermedad o

trastorno, es decir, provocar regresión. Por tanto, tratar, cuando se usa en la presente memoria, incluye, por ejemplo, la reparación y regeneración del tejido o las células dañadas o lesionadas en el sitio de la lesión o tratamientos profilácticos para prevenir el daño, por ejemplo, antes de la cirugía.

5 Cuando se usa en la presente memoria, "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico, la cual es capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido operativamente conectada y puede incluir un vector plásmido, cósmido o vírico. Un tipo de vector preferido es un epitoma, es decir, un ácido nucleico capaz de realizar replicación extra-cromosómica. Los vectores preferidos son aquellos capaces de realizar la replicación y/o expresión autónoma de los ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores pueden ser capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están operativamente unidos. Un vector también puede ser capaz de integrarse en el DNA huésped. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan intercambiamente ya que un plásmido (una agrupación circular de DNA con doble hebra) es la forma de vector más usualmente usada. Sin embargo, se pretende que la invención incluya tales otras formas de vectores que sirven de equivalentes funcionales y que llegarán a ser conocidas en la técnica después de esto. Los vectores víricos incluyen, por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados de replicación defectuosa.

15 6.2. Anticuerpos IgM naturales

La presente invención está basada, al menos en parte, en la identificación de inmunoglobulinas (Ig) naturales, en particular de IgMs naturales. Ciertas IgMs naturales pueden obtenerse del hibridoma que ha sido depositado con la American Type Culture Collection y al que se de ha dado en número de acceso PTA-3507.

20 La secuencia de nucleótidos de la región variable de las cadenas pesadas de la IgM producida por el hibridoma PTA-3507, IgM^{CM-22} (también denominada IgM 22A5) se muestra en la figura 1A (SEQ ID NO: 1), y la secuencia de aminoácidos se muestra en la figura 1B (SEQ ID NO: 2). El dominio CDR1 de la región variable de las cadenas pesadas corresponde a los aminoácidos 31 a 35 de SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 4), el cual está codificado por los nucleótidos 91-105 de SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 3), y el dominio CDR2 de la región variable de las cadenas pesadas corresponde a los aminoácidos 50 a 66 de SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 6), el cual está codificado por los nucleótidos 148-198 de SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 5).

25 La secuencia de nucleótidos de la región variable de las cadenas ligeras de IgM^{CM-22} se muestra en la figura 2A (SEQ ID NO: 7), y la secuencia de aminoácidos se muestra en la figura 2B (SEQ ID NO: 8). El dominio CDR1 de la región variable de las cadenas ligeras corresponde a los aminoácidos 23 a 37 de SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 10), el cual está codificado por los nucleótidos 67-111 de SEQ ID NO: 7 (SEQ ID NO: 9), y el dominio CDR2 de la región variable de las cadenas ligeras corresponde a los aminoácidos 53 a 59 de SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 12), el cual está codificado por los nucleótidos 157-177 de SEQ ID NO: 7 (SEQ ID NO: 11). Debido a la degeneración del código genético, otras secuencias de nucleótidos pueden codificar a las secuencias de aminoácidos listadas en la presente memoria.

30 Las composiciones de ácidos nucleicos de la presente invención, aunque con frecuencia están en una secuencia natural (excepto para sitios de restricción modificados y semejantes), a partir de cDNA, DNA genómico o mezclas, pueden mutarse según técnicas estándar. Para las secuencias codificantes, estas secuencias pueden afectar a la secuencia de aminoácidos como se desee. En particular, se contemplan secuencias de nucleótidos sustancialmente idénticas a o derivadas de conmutadores V, D, J, constantes naturales y otras de tales secuencias descritas en la presente memoria.

35 Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede comprender una secuencia de nucleótidos de la región variable de las cadenas pesadas de IgM^{CM-22} (o IgM 22A5) que tiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en la figura 1A (SEQ ID NO: 1), o una secuencia, la cual es al menos 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a SEQ ID NO: 1. Una molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 de CDR1 de las cadenas pesadas, o una de sus porciones. Además, la molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 de CDR2 de las cadenas pesadas, o una de sus porciones. Una molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 de CDR1 de las cadenas pesadas, o una de sus porciones y una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 de CDR2 de las cadenas pesadas, o una de sus porciones. Una molécula de ácido nucleico puede comprender secuencias de cadenas pesadas, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o combinaciones de las mismas, o englobar nucleótidos que al menos tengan una identidad de secuencia de 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% a SEQ ID NOS: 1, 3 ó 5. Además, una molécula de ácido nucleico puede comprender secuencias de cadenas pesadas, las cuales se hibridan en condiciones rigurosas, por ejemplo, en condiciones poco rigurosas, de moderada rigurosidad, rigurosas o muy rigurosas, a SEQ ID NOS: 1, 3 ó 5.

40 En la presente memoria se describen moléculas de ácidos nucleicos que al menos tienen una identidad de secuencia de 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con una molécula de ácido nucleico que codifica a un polipéptido de cadena pesada, por ejemplo, a un polipéptido de SEQ ID NOS: 2, 4 ó 6 de las cadenas pesadas. También se describen moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan a secuencias de ácidos nucleicos que codifican una región variable de las cadenas pesadas de un anticuerpo natural o una porción de la misma, por ejemplo, una región variable de las cadenas pesadas de SEQ ID NOS: 2, 4 ó 6.

55 Una molécula aislada de ácido nucleico puede codificar una secuencia de nucleótidos de la región variable de las cadenas ligeras de IgM^{CM-22} (o IgM 22A5) que tiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en la figura 2A (SEQ

5 ID NO: 7), o una secuencia al menos 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idéntica a SEQ ID NO: 7. La molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9 de CDR1 de las cadenas ligeras, o una de sus porciones. En otra realización preferida, la molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 de CDR2 de las cadenas ligeras, o una de sus porciones. Una molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 de CDR2 de las cadenas ligeras, o una porción de la misma. En una realización ejemplo, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9 de CDR1 de las cadenas ligeras, o una de sus porciones, y una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 de CDR2 de las cadenas ligeras, o una de sus porciones. Las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención pueden comprender secuencias de cadenas ligeras, por ejemplo, SEQ ID NOs: 7, o u 11, o combinaciones de las mismas, o englobar nucleótidos que al menos tengan una identidad de secuencia de 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% a SEQ ID NOs: 7, 9 u 11. Otras moléculas de ácidos nucleicos pueden comprender secuencias de cadenas ligeras, las cuales se hibridan en condiciones rigurosas, por ejemplo, en condiciones poco rigurosas, de moderada rigurosidad, rigurosas o muy rigurosas, a SEQ ID NOs: 7, 9 u 11.

10 Las moléculas de ácidos nucleicos pueden tener al menos una identidad de secuencia de 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% con una molécula de ácido nucleico que codifica a un polipéptido de cadena ligera, por ejemplo, un polipéptido de SEQ ID NOs: 8, 10 ó 12 de las cadenas ligeras. La invención también caracteriza moléculas de ácidos nucleicos las cuales se hibridan a una secuencia de ácido nucleico que codifica a una región variable de las cadenas ligeras de un anticuerpo natural o de una de sus porciones, por ejemplo una región variable de las cadenas ligeras de SEQ ID NOs: 8, 10 ó 12.

20 En la presente memoria se describe un ácido nucleico aislado que codifica un dominio CDR1 de las cadenas pesadas que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o un fragmento o forma modificada de la misma. El ácido nucleico puede codificar sólo la región CDR1 o puede codificar una región variable completa de las cadenas pesadas del anticuerpo o un fragmento de la misma. Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar una región variable de las cadenas pesadas que tenga un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

25 En la presente memoria también se describe un ácido nucleico aislado que codifica un dominio CDR2 de las cadenas pesadas que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, o un fragmento o forma modificada de la misma. El ácido nucleico puede codificar sólo la región CDR2 o puede codificar una región variable completa de las cadenas pesadas del anticuerpo o un fragmento de la misma. Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar una región variable de las cadenas pesadas que tenga un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

30 La invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un dominio CDR1 de las cadenas ligeras que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, o un fragmento o forma modificada de la misma. Este ácido nucleico puede codificar sólo la región CDR1 o puede codificar una región variable completa de las cadenas ligeras del anticuerpo. Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar una región variable de las cadenas ligeras que tenga un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

35 El ácido nucleico aislado también codifica un dominio CDR2 de las cadenas ligeras que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, o un fragmento o forma modificada de la misma. El ácido nucleico puede codificar sólo la región CDR2 o puede codificar una región variable completa de las cadenas ligeras del anticuerpo. Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar una región variable de las cadenas ligeras que tenga un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

40 El ácido nucleico que codifica la región variable de las cadenas pesadas o ligeras puede ser de origen murina o humano, o puede comprender una combinación de secuencias de aminoácidos de origen murina o humano. Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar una región variable de las cadenas pesadas que comprenda el CDR1 de SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 4) y/o el CDR2 de SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 6), y una secuencia del marco de ser humano. Además, el ácido nucleico puede codificar una región de las cadenas ligeras que comprende el CDR1 de SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 10) y/o el CDR2 de SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 12), y una secuencia del marco de ser humano. Además, la invención engloba vectores que contienen los ácidos nucleicos anteriormente descritos y células huésped que contienen los vectores de expresión.

45 La invención también caracteriza polipéptidos y fragmentos de las regiones variables de las cadenas ligeras de IgM^{CM-22}. En realizaciones ejemplo, los polipéptidos aislados comprenden, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 8, 10 ó 12, o fragmentos o combinaciones de las mismas.

50 Los polipéptidos de la presente invención incluyen polipéptidos que al menos tienen, pero no más que 20, 10, 5, 4, 3, 2 ó 1 aminoácido que difiere de SEQ ID NOs: 8, 10 ó 12. Los polipéptidos ejemplo son polipéptidos que retienen actividad biológica, por ejemplo, la capacidad para enlazarse a un antígeno específico de la isquemia y/o la capacidad de enlazarse al complemento. En otra realización, los polipéptidos comprenden polipéptidos que al menos tienen una identidad de secuencias de 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% con una región variable de las cadenas ligeras, o una porción de la misma, por ejemplo un polipéptido de SEQ ID NOs: 8, 10 ó 12 de la región variable de las cadenas ligeras.

En otra realización, la invención caracteriza a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y de SEQ ID NO: 2, que además comprende una secuencia IRES.

6.3. Agentes inhibidores de anticuerpos IgM

5 6.3.1. Agentes inhibidores tipo péptidos de anticuerpos IgM naturales

La invención además caracteriza a agentes inhibidores de IgM. En una realización, el agente inhibidor de IgM es un péptido que se enlaza específicamente a una IgM natural y de esta manera bloquea el enlace al antígeno. Tales péptidos pueden incluir los péptidos ricos en asparagina descritos en la tabla 1 siguiente, excluyendo SEQ ID NO: 34.

Tabla 1: secuencias de aminoácidos de péptidos que se enlazan a anticuerpos IgM naturales

SEQ ID NO:	SECUENCIA	Nombre
14	xNNNxNNxNNNN	Consenso rico en asparagina
16	YNNNNGNYTYRN	P1
18	ANTRNGATNNNM	P2
20	CDSSCDSVGN CN	P3
22	WNNNGRNACNAN	P4
24	HNSTSNGCNDNV	P5
26	NSNSRYNSNSNN	P6
28	KRNNHNNHNRSN	P7
30	NGNNVNGNRNNN	P8
32	NVANHHNSNHGN	P9
34	SYNNNNHVSNRN	P10

10

Los péptidos también pueden incluir ciertos “auto-péptidos” que se describen a continuación en la tabla 2.

Tabla 2: secuencias de aminoácidos de auto-péptidos

SEQ ID NO:	SECUENCIA	Nombre
36	LMKNMDPLNDNI	Auto-1
38	LMKNMDPLNDNV	Auto-2 (“N-2”)

15

Como se describe con más detalle en la sección de ejemplos, los auto-péptidos se enlazan a IgM^{CM-22} de anticuerpos IgM naturales.

20

Además, los péptidos descritos anteriormente, la presente invención engloba péptidos modificados cuya actividad puede identificarse y/o analizarse usando una variedad de métodos bien conocidos por un experto. Por ejemplo, el enlace del péptido a la IgM puede detectarse usando ensayos biológicos, técnicas de inmunotransferencia, inmunoprecipitación o inmunocitoquímicas, tales como las descritas a continuación. En particular, la actividad biológica (por ejemplo, la capacidad para enlazarse a un anticuerpo IgM natural) de un péptido modificado puede caracterizarse con relación a la de P8 (SEQ ID NO: 30) o N2 (SEQ ID NO: 38).

25

Cuando se diseñan para que retengan al menos una actividad de la forma de la proteína que se encuentra en la naturaleza, tales péptidos modificados se consideran “equivalentes funcionales” de los péptidos descritos con más detalle en la presente memoria. Tales péptidos modificados pueden producirse, por ejemplo, por sustitución, supresión o adición de aminoácidos, sustituciones que pueden consistir en parte o en todo por sustituciones de aminoácidos conservadores.

Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada por un aminoácido conservador, tal como el reemplazamiento de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, o una treonina con una serina, no tendrá un gran efecto sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Puede determinarse fácilmente si

un cambio en la secuencia de aminoácidos de un péptido da lugar a un homólogo funcional ensayando la capacidad del péptido variante (por ejemplo, la capacidad para unirse a anticuerpos IgM naturales) de producir una respuesta similar a la del péptido silvestre. Los péptidos en los que ha ocurrido más de un reemplazamiento pueden ensayarse fácilmente de la misma manera.

5 La mutagénesis del péptido puede dar lugar a homólogos, los cuales tienen semividas *in vivo* mayores relativas al péptido silvestre correspondiente. Por ejemplo, el péptido alterado puede hacerse más estable a la degradación proteolítica o a otros procesos celulares que dan lugar a la destrucción o inactivación de la proteína.

10 Las secuencias de aminoácidos de una población de péptidos homólogos pueden alinearse, preferiblemente para promover la mayor homología posible. Tal población de variantes puede incluir, por ejemplo, homólogos de una o más especies, u homólogos de las mismas especies pero que difieren debido a la mutación. Los aminoácidos que aparecen en cada posición de las secuencias alineadas se seleccionan para crear una serie degenerada de secuencias combinatorias. En ciertas realizaciones, la biblioteca combinatoria se produce por medio de una biblioteca degenerada de genes que codifican una biblioteca de polipéptidos cada uno de los cuales incluyen al menos una porción de secuencias potenciales de péptidos. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos pueden ligarse enzimáticamente en secuencias de genes tal que la serie degenerada de secuencias potenciales de nucleótidos son expresables como polipéptidos individuales, o alternativamente, como una serie de proteínas de fusión mayores (por ejemplo, expresión en fagos).

20 Hay muchas formas mediante las cuales puede generarse la biblioteca de homólogos potenciales a partir de una secuencia degenerada de oligonucleótido. La síntesis química de una secuencia degenerada de un gen puede llevarse a cabo en un sintetizador automático de DNA, y los genes sintéticos pueden entonces ligarse a un vector apropiado para la expresión. Un fin de una serie degenerada de genes es proporcionar, en una mezcla, todas las secuencias que codifican la serie deseada de secuencias potenciales de péptidos. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al., (1981) recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Symp. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp. 273-289; Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura et al., (1984) Science 198: 1056; Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). Tales técnicas han sido empleadas en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott et al., (1990) Science 249:386-390; Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) Science 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; así como las patentes de EE.UU. n°s: 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

30 Alternativamente, pueden utilizarse otras formas de mutagénesis para generar una biblioteca combinatoria. Por ejemplo, pueden generarse péptidos homólogos y aislarse de una biblioteca mediante selección usando, por ejemplo, mutagénesis de barrido con alanina y semejantes (Ruf et al., (1994) Biochemistry 33: 1565-1572; Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269: 3095-3099; Balint et al., (1993) Gene 137: 109-118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218: 597-601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268: 2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30: 10832-10838; y Cunningham et al., (1989) Science 244: 1081-1085), por mutagénesis de barrido con un conector (Gustin et al., (1993) Virology 193: 653-660; Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12: 2644-2652; McKnight et al., (1982) Science 232: 316); por mutagénesis de saturación (Meyers et al., (1986) Science 232: 613); por mutagénesis PCR (Leung et al., (1989) Method Cell Mol. Biol. 1: 11-19); o por mutagénesis al azar (Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; y Greener et al., (1994) Strategies en Mol. Biol. 7: 32-34).

40 En la técnica se conocen un amplia gama de técnicas para seleccionar productos genéticos de bibliotecas combinatorias fabricadas por mutaciones y truncamientos puntuales, y para seleccionar en bibliotecas de cDNA productos genéticos que tienen una cierta propiedad (por ejemplo, la capacidad para enlazarse a un anticuerpo IgM natural). Tales técnicas se adaptarán en general para una selección rápida de las bibliotecas genéticas generadas por mutagénesis combinatoria de péptidos homólogos. La mayor parte de las técnicas usadas para explorar grandes bibliotecas genéticas comprenden el clonado de la biblioteca genética en vectores de expresión replicables, la transformación de células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y al expresión de genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita relativamente el fácil aislamiento del vector que codifica al gen cuyo producto fue detectado. Cada uno de los ensayos ilustrativos descritos más adelante es susceptible a un análisis de alta productividad que es necesario para seleccionar grandes números de secuencias degeneradas creadas por técnicas de mutagénesis combinatoria.

50 En una realización ilustrativa de un ensayo de selección, los productos candidato de genes combinatorios se pasan por una columna que contiene bolas a las que está unida la proteína de unión, tal como una IgM o una porción de la misma. Aquellos productos candidatos de genes combinatorios que son retenidos en la columna pueden caracterizarse adicionalmente respecto a su unión a IgMs de una manera que podría ser útil para bloquear la unión a anticuerpos IgM naturales y tratar las enfermedades inflamatorias.

55 En otro ejemplo, la biblioteca de genes puede expresarse como una proteína de fusión sobre la superficie de una partícula vírica. Por ejemplo, en el sistema de fagos filamentosos pueden expresarse secuencias de péptidos extrañas sobre la superficie de fagos infecciosos, mediante lo cual se confieren dos beneficios. En primer lugar, debido a que estos fagos pueden aplicarse a matrices de afinidad en concentraciones muy altas pueden explorarse al mismo tiempo

5 un gran número de fagos. En segundo lugar, debido a que cada fago infeccioso muestra el producto del gen combinatorio sobre su superficie, el fago puede amplificarse mediante otra ronda de infección si un fago particular es recuperado de una matriz de afinidad con un bajo rendimiento. El grupo de fagos filamentosos M13, fd y fl casi idénticos a *E. coli* se usa con frecuencia en bibliotecas de expresión en fagos, como pueden usarse proteínas de revestimiento tanto del fago gIII como del gVIII para generar proteínas de fusión sin desorganizar el empaquetamiento último de la partícula vírica (Lander et al., publicación PCT WO 90/02909; Garrard et al., publicación PCT WO 92/09690; Marks et al., (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 16007-16010; Griffiths et al., (1993) *EMBO J.* 12: 725-734; Clackson et al., (1991) *Nature* 352: 624-628 y Barbas et al., (1992) *PNAS USA* 89: 4457-4461). Cuando sea apropiado pueden usar otras proteínas de revestimiento de fagos.

10 En la presente memoria también se describen compuestos miméticos (por ejemplo, agentes no peptídicos) que son capaces de mimetizar el enlace del péptido auténtico a un anticuerpo IgM natural. Por ejemplo, los residuos críticos de un péptido que están implicados en el reconocimiento molecular de un anticuerpo IgM natural pueden determinarse y usarse para generar el compuesto péptido-mimético que se enlaza a un anticuerpo IgM natural. El compuesto péptido-mimético puede entonces usarse como un agente inhibidor de la proteína silvestre enlazándose a los anticuerpos IgM naturales y cubriendo los residuos críticos necesarios para la interacción con la proteína silvestre, mediante lo cual se impide la interacción de la proteína y el anticuerpo IgM natural. Pueden generarse compuestos péptido-miméticos que mimetizan aquellos residuos en el enlace al anticuerpo IgM natural. Por ejemplo, pueden generarse análogos no hidrolizables de péptidos de tales residuos usando benzodiazepina (por ejemplo, véase Freidinger et al., en *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1998), azepina (por ejemplo, véase Fuman et al., en *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1998), anillos de gamma lactama sustituidos (Garvey et al., en *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1998), pseudopéptidos de cetometileno (Ewenson et al., (1986) *J. Med. Chem.* 29: 295; y Ewenson et al., en *Peptides: Structure and Function Proceedings of the 9th American Peptide Symposium*) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985), núcleos de péptidos con giro β (Nagai et al., (1985) *Tetrahedron Lett* 26: 647; y Sato et al., (1986) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 1231), y β -aminoalcoholes (Gordon et al., (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 419; y Dann et al., (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 71).

6.3.2. Ácidos nucleicos que codifican agentes inhibidores

La invención también caracteriza ácidos nucleicos, los cuales codifican los péptidos tratados anteriormente. Ácidos nucleicos ejemplo se proporcionan en la tabla 3, excluyendo SEQ ID NO: 33.

Tabla 3. Ácidos nucleicos que codifican péptidos que se enlazan a anticuerpos IgM naturales

SEQ ID NO:	SECUENCIA	Nombre
13	NNN AAY AAY AAY NNN AAY AAY NNN AAY AAY AAY AAY	Consenso rico en asparagina
15	TAY AAY AAY AAY AAY GGN AAY TAY CAN TAY MGN AAY	P1
17	GCN AAY CAN MGN AAY GGN GCN CAN AAY AAY AAY ATG	P2
19	TGY GAY WSN WSN TGY GAY WSN GTN GGN AAY TGY AAY	P3
21	TGG AAY AAY AAY GGN MGN AAY GCN TGY AAY GCN AAY	P4
23	CAY AAY WSN ACN WSN AAY GGN TGY AAY GAY AAY GTN	P5
25	AAY WSN AAY WSN MGN TAN AAN WSN AAY WSN AAY AAY	P6
27	AAR MGN AAY AAY CAY AAY AAY CAY AAY MGN WSN AAY	P7
29	AAY GGN AAY AAY GTN AAY GGN AAY MGN AAY AAY AAY	P8
31	AAY GTN GCN AAY CAY AAY AAY WSN AAY CAY GCN AAY	P-9
33	WSN TAY AAY AAY AAY AAY CAY GTN WSN AAY MGN AAY	P-10
35	YTN ATG AAR AAY ATG GAY CCN YTN AAY GAY AAY ATH	Auto-1
37	YTN ATG AAR AAY ATG GAY CCN YTN AAY GAY AAY GTN	Auto-2

- 5 Los ácidos nucleicos de la tabla 3 reflejan degeneración en el código genético. En particular, un "R" corresponde a una base que puede ser una A o una G; una "S" corresponde a una base que puede ser una G o un C; una "V" corresponde a una base que puede ser una A, C o G; una "Y" corresponde a una base que puede ser una C o una T; una "W" corresponde a una base que puede ser una A o una T; una "D" corresponde a una base que puede ser una A, G o T; una "M" corresponde a una base que puede ser una A o una C; una "H" corresponde a una base que puede ser una A, C o T; una "N" corresponde a una base que puede ser una A, C, G o T; una "K" corresponde a una base que puede ser una G o una T y una "B" corresponde a una base que puede ser una C, G o T.
- 10 Se espera que entre las células de los mamíferos existan polimorfismos de secuencias de DNA que conduzcan a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objeto. Un experto en la técnica apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (de menos que 1% hasta aproximadamente 3 ó 5% o posiblemente más de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican a un péptido particular de la invención pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. Cualquiera y todas de tales variaciones de nucleótidos y
- 15 polimorfismos de aminoácidos resultantes están dentro del alcance de esta invención. Los ácidos nucleicos preferidos codifican a un péptido, el cual es al menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homólogo o más con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 u otro péptido de la invención. Los ácidos nucleicos que codifican péptidos que tienen una actividad de un péptido de la invención y que al menos tienen una homología de aproximadamente 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o más con SEQ
- 20 ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38 u otro péptido de la invención también están dentro del alcance de la invención.

La preferencia en la selección de codones dentro de una única especie parece relacionada con el nivel de expresión de la proteína codificada por ese gen. Por consiguiente, la invención engloba secuencias de ácidos nucleicos que han sido optimizadas para mejorar la expresión en una célula huésped alternando la frecuencia del uso de codones en la secuencia de ácido nucleico para acercarse a la frecuencia de uso preferida de codones de la célula huésped. Debido a la degeneración de codones, es posible optimizar la secuencia de nucleótidos sin afectar a la secuencia de aminoácidos de polipéptido codificado. Por consiguiente, la presente invención se relaciona con cualquier secuencia de nucleótidos que codifique los péptidos puestos de manifiesto en SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38 u otros péptidos de la invención.

Los ácidos nucleicos dentro del alcance de la invención también pueden contener secuencias de conectores, sitios modificados de endonucleasas de restricción y otras secuencias útiles para la clonación, expresión o purificación molecular de tales polipéptidos recombinantes.

Un ácido nucleico que codifica un péptido de la invención puede obtenerse a partir de mRNA o DNA genómico a partir de cualquier organismo según protocolos descritos en la presente memoria, así como con los generalmente conocidos por los expertos. Por ejemplo, un cDNA que codifica a un péptido de la invención puede obtenerse aislando mRNA total de un organismo, por ejemplo una bacteria, un virus, un mamífero, etc. A continuación, pueden prepararse cDNAs de doble hebra a partir del mRNA total, e insertarse subsiguientemente en un vector plásmido o bacteriófago adecuado usando una cualquiera de varias técnicas conocidas. También puede clonarse un gen que codifica a un péptido de la invención usando técnicas establecidas de reacción en cadena de la polimerasa según la información de la secuencia de nucleótidos proporcionada por la invención.

En otro aspecto de la invención, se proporciona el ácido nucleico objeto en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica a un péptido de la invención y operablemente conectado a al menos una secuencia reguladora. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la selección de la célula huésped a transformar y/o del tipo de proteína que se desea expresar. Por otra parte, también debe considerarse el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como marcadores antibióticos.

Como será evidente, pueden usarse los constructos del gen objeto para provocar la expresión de un péptido de la invención en células propagadas en el cultivo, por ejemplo, para producir proteínas o polipéptidos, incluyendo proteínas de fusión o polipéptidos, incluyendo proteínas de fusión, para purificar.

Esta invención también está relacionada con una célula huésped aislada transfectada con un gen recombinante con el fin de expresar un péptido de la invención. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de la presente invención puede expresarse en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insectos (baculovirus), levaduras o células de mamíferos. Los expertos en la técnica conocen otras células huésped adecuadas. Adicionalmente, con el fin de optimizar la expresión del péptido, la célula huésped puede estar suplementada con moléculas de tRNA que no se encuentran típicamente en el huésped. Otros métodos adecuados para maximizar la expresión del péptido serán conocidos por los expertos en la técnica.

6.3.3. Métodos para producir agentes inhibidores de péptidos

Pueden sintetizarse agentes inhibidores de péptidos, por ejemplo, químicamente, ribosómicamente en un sistema exento de células, o ribosómicamente dentro de una célula. La síntesis química de péptidos de la invención pueden llevarse a cabo usando una variedad de métodos reconocidos en la técnica, que incluyen la síntesis paso a paso en fase sólida, la semi-síntesis a través de religadura asistida conformacionalmente de fragmentos de péptidos, la ligadura enzimática de segmentos clonados o sintéticos de péptidos y la ligadura química. Merrifield et al., *J. Am. Chem. Soc.*, volumen 85, página 2149 (1964), por Houghten et al. en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, volumen 82, página 5132 (1985), y por Stewart y Young en *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chem. Co, Rockford, Ill. (1984). La ligadura química natural emplea una reacción quimioselectiva de los segmentos de péptidos no protegidos para producir un compuesto intermedio transitorio conectado por puentes tioéster. El compuesto intermedio transitorio conectado por puentes tioéster experimenta a continuación espontáneamente una transposición para dar el producto de ligadura de longitud completa que tiene un enlace peptídico natural en el sitio de ligadura. Los productos de ligadura de longitud completa son químicamente idénticos a las proteínas producidas mediante síntesis exenta de células. Los productos de ligadura de longitud completa pueden replegarse y/u oxidarse, como se permita, para formar moléculas proteicas naturales que contienen puentes disulfuro. (Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n°s 6.184.344 y 6.174.530; y T.W. Muir et al., *Curr. Opin. Biotech.* (1993); vol. 4, p. 420; M. Miller et al., *Science* (1989): vol. 246, p. 1149; A. Wlodawer et al., *Science* (1989): vol. 245, p. 616; L.H. Huang et al., *Biochemistry* (1991): vol. 30, p. 7402; M. Schnolzer et al., *Int. J. Pept. Prot. Res.* (1992): vol. 40, p. 180-193; K. Rajarathnam et al., *Science* (1994): vol. 264, p. 90; R. E. Offord, "Chemical Approaches to Protein Engineering", en *Protein Design and the Development of New Therapeutics and Vaccines*, J.B. Hook, G. Poste, Eds., (Plenum Press, Nueva York, 1990) pp. 253-282; C.J.A. Wallace et al., *J. Biol. Chem.* (1992): vol. 267, p. 3852; L. Abrahmsen et al., *Biochemistry* (1991): vol. 30, p. 4151; T. K. Chang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91: 12544-12548; M. Schnlzer et al., *Science* (1992): vol., 3256, p. 221; y K. Akaji et al., *Chem. Pharm. Bull. (Tokio)* (1985) 33: 184).

- En otra variación, la producción de péptidos puede conseguirse usando un sistema de traducción *in vitro*. Un sistema de traducción *in vitro* es, en general, un sistema de traducción que es un extracto exento de células que al menos contiene los elementos mínimos necesarios para la traducción de una molécula de RNA en una proteína. Un sistema de traducción *in vitro* comprende típicamente al menos ribosomas, tRNAs, metionil-tRNAMet iniciador, proteínas o complejos implicados en la traducción, por ejemplo, eIF2, eIF3, el complejo ligado a la caperuza (CB), que comprende la proteína ligada a la caperuza (CBP) y el factor de iniciación eucariótico 4F (eIF4F). En la técnica son conocidos una variedad de sistemas de traducción e incluyen kits comercialmente disponibles. Ejemplos de sistemas de traducción *in vitro* incluyen lisados eucarióticos, tales como lisados de reticulocitos de conejo, lisados de oocitos de conejo, lisados de células de ser humano, lisados de células de insectos y extractos de germen de trigo.
- Los lisados están comercialmente disponibles en fabricantes tales como Promega Corp., Madison Wis.; Stratagene, La Jolla, Calif.; Amersham, Arlington Heights, Ill; y GIBCO/BRL, Grand Island, N.Y. Los sistemas de traducción *in vitro* comprenden típicamente macromoléculas, tales como enzimas, factores de traducción, iniciación y elongación, reactivos químicos y ribosomas.
- Además, puede usarse un sistema de transcripción *in vitro*. Típicamente, tales sistemas comprenden al menos una holoenzima de RNA polimerasa, ribonucleótidos y cualquier factor de iniciación, elongación y terminación de la transcripción. La transcripción y la traducción *in vitro* pueden llevarse a cabo dentro de la misma reacción para producir péptidos a partir de uno o más DNAs aislados.
- Los ácidos nucleicos que codifican agentes inhibidores de péptidos pueden ser expresados *in vitro* por transferencia de DNA en una célula huésped adecuada. La expresión de péptidos puede ser facilitada insertando los ácidos nucleicos que codifican a los péptidos en un vector, tal como un plásmido, virus u otro vehículo conocido en la técnica que ha sido manipulado por inserción o incorporación en las secuencias genéticas naturales de péptidos que se enlazan a anticuerpos. Tales vectores contienen una secuencia promotora la cual facilita la transcripción eficiente de la secuencia genética insertada del huésped. Típicamente, el vector contiene un origen de replicación, un promotor, así como genes específicos que permiten la selección fenotípica de las células transformadas. Los vectores adecuados para usar en la presente invención incluyen pero no se limitan a, el vector de expresión basado en T7 para la expresión en bacterias (Rosenberg et al., Gene, 56: 125, 1987), el vector de expresión pMSXND para la expresión en células de mamíferos (Lee y Nathans, J. Biol. Chem. 263: 3521, 1988) y vectores derivados de baculovirus para la expresión en células de insectos. El segmento de DNA puede estar presente en el vector operablemente conectado a elementos reguladores, por ejemplo, un promotor (por ejemplo, los promotores T7, metalotioneína I o las polihedrinas).
- Los ácidos nucleicos que codifican agentes inhibidores de péptidos pueden ser expresados bien en procariotas o bien en eucariotas. Los huéspedes pueden incluir organismos microbianos, levaduras, insectos y mamíferos. Los métodos para expresar secuencias de DNA que tienen secuencias eucariotas o víricas en procariotas son bien conocidos en la técnica. Los vectores tipo DNA vírico y plásmido biológicamente funcionales capaces de expresión y replicación en un huésped son bien conocidos en la técnica. Tales vectores pueden incorporar secuencias de DNA de la invención. Para construir vectores que contienen la secuencia natural que codifica el péptido que se enlaza a anticuerpos y señales de control transcripcionales/traductorales pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos métodos incluyen técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y técnicas de recombinación/genéticas *in vivo*. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis et al., 1989 Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.).
- Pueden utilizarse una variedad de sistemas de huésped-vector de expresión. Éstos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión tipo DNA recombinante de bacteriófago, DNA plásmido o DNA cósmido; levaduras transformadas con vectores de expresión recombinantes de levaduras; sistemas de células de plantas infectadas con vectores de expresión recombinantes de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión recombinantes de plásmidos (por ejemplo, plásmido Ti); sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión recombinantes de virus (por ejemplo, baculovirus); o sistemas de células de animales infectadas con vectores de expresión recombinantes de virus (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, virus vacuna), o sistemas transformados de células de animales diseñados para su expresión estable.
- Dependiendo del sistema huésped/vector utilizado, en el vector de expresión puede usarse cualquiera de varios elementos adecuados de transcripción y traducción, que incluyen promotores constitutivos e inducibles, elementos que potencian la transcripción, agentes de terminación de la transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bitter et al., 1987, Methods in Enzymology 153: 516-544). Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles como pL de bacteriófago γ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y semejantes. Cuando se clona en sistemas de células de mamíferos, pueden usarse promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o virus de mamíferos (por ejemplo, la repetición terminal larga de retrovirus; el promotor tardío de adenovirus; el promotor virus vacuna de 7,5K). También pueden usarse promotores producidos por técnicas de DNA recombinante o sintéticas.
- En levaduras pueden usarse varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles. Para una revisión véase Current Protocols en Molecular Biology, Vol. 2, 1988, Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley

Interscience, Ch. 13; Grant et al., 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, en *Methods in Enzymology*, Eds. Wu & Grossman, 31987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, pp. 516-544; Glover, 1986, DNA Cloning, Vol. UU, IRL Press, Wash., D.C., Ch. 3; y Bitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, *Methods in Enzymology*, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., Vol. 152, pp. 673-684; y *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, 1982, Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I y II. Puede usarse un promotor constitutivo de levaduras tal como ADH o LEU2 o un promotor inducible tal como GAL (*Cloning in Yeast*, Ch. 3, R. Rothstein En: DNA Cloning Vol. 11, A Practical Approach, Ed. DM Glover, 1986, IRL Press, Wash., D.C.). Alternativamente, pueden usarse vectores que promuevan la integración de secuencias extrañas de DNA en el cromosoma de levaduras.

Los sistemas eucariotas, y preferiblemente los sistemas de expresión en mamíferos, permiten que ocurran modificaciones post-traducción apropiadas de proteínas expresadas en mamíferos. Como células huésped pueden usarse células eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesado apropiado del transcripto primario, la glicosilación, la fosforilación y, ventajosamente, la inserción en la membrana plasmática del producto del gen.

Los sistemas de células de mamíferos que utilizan virus recombinantes o elementos víricos para dirigir la expresión pueden diseñarse genéticamente. Por ejemplo, cuando se usan vectores de expresión de adenovirus una secuencia natural que codifica un péptido que se enlaza a anticuerpos puede estar ligada a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Alternativamente, puede usarse el promotor de 7,5K de virus vacuna (véase, por ejemplo, Mackkett et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7415-7419; Mackkett et al., 1984, J. Virol. 49: 857-864; Panicali et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4927-4931). De particular interés son los vectores basados en el virus del papiloma bovino los cuales tienen la capacidad para replicarse como elementos extracromosómicos (Sarver et al., 1981, Mol. Cell. Biol. 1: 486). Poco después de la entrada de este DNA en células de ratón, el plásmido se replica hasta aproximadamente 100 a 200 copias por célula. La transcripción del cDNA insertado no requiere la integración del plásmido en el cromosoma del huésped, mediante lo cual dan un alto nivel de expresión. Estos vectores pueden usarse para la expresión estable incluyendo un marcador seleccionable en el plásmido tal como, por ejemplo, el gen neo. Alternativamente, el genoma retrovírico puede modificarse para usarse como un vector capaz de introducir y dirigir la expresión de un gen natural de un péptido que se enlaza a anticuerpos en células huésped (Cone & Mulligan, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6349-6353). También puede conseguirse un alto nivel de expresión usando promotores inducibles, que incluyen, pero no se limitan a, el promotor metalotionina IIA y promotores de choque térmico.

Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Más que usar vectores de expresión que contengan orígenes víricos de replicación, las células huésped pueden transformarse con un cDNA controlado por elementos apropiados de control de la expresión (por ejemplo, un promotor, un potenciador, secuencias, agentes de terminación de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos los cuales a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Por ejemplo, tras la introducción de DNA extraño, puede permitirse que las células diseñadas genéticamente crezcan 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. Pueden usarse varios sistemas de selección, que incluyen pero no se limitan a, genes de timidina quinasa del virus del herpes simples (Wigler et al., 1977, Cell 11: 223), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., 1980, Cell 22: 817) y pueden emplearse en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Asimismo, puede usarse la resistencia antimetabolitos como la base de selección de genes dhfr, el cual confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072; neo, el cual confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150: 1); e hygro, el cual confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., 1984, Gene 30: 147).

Genes adicionales seleccionables incluyen trpB, el cual permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano; hisD, el cual permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman & Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8047); y ODC (ornitina descarboxilasa) el cual confiere resistencia al agente inhibidor de la ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue L., 1987, en: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed.).

Para líneas celulares recombinantes estables, los tipos adecuados de células incluyen, pero no se limitan a, células de los siguientes tipos: NIH 3T3 (murina), C2C12, L6 y P19. Los mioblastos C2C12 y L6 se diferenciarán espontáneamente en el cultivo y formarán miotubos dependiendo de las condiciones particulares de crecimiento (Yaffe y Saxel, 1977; Yaffe, 1968). P19 es una línea celular embrionica de carcinoma. Tales células son descritas, por ejemplo, en el Cell Line Catalog de la American Type Culture Collection (ATCC). Estas células pueden ser establemente transformadas mediante un método conocido por los expertos. Véase, por ejemplo, Aussubel et al., *Introduction of DNA into Mammalian Cells*, en *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, secciones 9.5.1-9.5.6 (John Wiley & Sons Inc. 1995). En el contexto de la invención, transformación "estable" quiere decir que las células son inmortales en la extensión de haber pasado por al menos 50 divisiones.

5 Cuando el huésped es un eucariota, pueden usarse métodos de transfección de DNA tales como coprecipitados con fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encerrado en liposomas, o virus vectores. Las células eucariotas también pueden cotransformarse con secuencias de DNA que codifican péptidos naturales que se enlazan a anticuerpos, y una segunda molécula de DNA
 10 extraño que codifica un fenotipo seleccionable, tal como el gen de la timidina quinasa del herpes simplex. Otro método es usar un vector vírico eucariota, tal como el virus 40 del simio (SV40) o el virus del papiloma bovino, para infectar o transformar transitoriamente células eucariotas y expresar la proteína (véase, por ejemplo, Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman et al., 1982).

10 Para interactuar con anticuerpos naturales o para aislar y purificar, puede necesitarse que las proteínas naturales que se enlazan a anticuerpos sean secretadas por la célula huésped. Por consiguiente, puede usarse una secuencia señal para dirigir la salida del péptido de la célula huésped cuando se sintetice.

15 Típicamente, la secuencia señal está posicionada en la región codificante de la secuencia del ácido nucleico, o directamente en el extremo 5' de la región codificante. Se han identificado muchas secuencias señal y puede usarse cualquiera que sea funcional en la célula huésped seleccionada. Por consiguiente, la secuencia señal puede ser homóloga o heteróloga al polipéptido. Adicionalmente, la secuencia señal puede sintetizarse químicamente usando técnicas de DNA recombinante bien conocidas en la técnica.

20 La cantidad de péptido producida en la célula huésped puede evaluarse usando métodos estándar en la técnica. Tales métodos incluyen, sin limitación, análisis de inmunotransferencia, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis en gel no desnaturante, separación por HPLC, inmunoprecipitación y/o ensayos de actividad tales como ensayos de unión al DNA por retardo en gel.

25 Cuando se secretan péptidos naturales de unión a anticuerpos de las células huésped, la mayoría del péptido probablemente se encontrará en el medio de cultivo celular. Si, sin embargo, el péptido no se secreta, estará presente en el citoplasma (para eucariotas, bacterias Gram positivas y células huésped de insectos) o en el periplasma (para células huésped de bacterias Gram negativas).

30 Si el péptido natural que se une a anticuerpos permanece en el espacio intracelular, típicamente las células huésped son en primer lugar rotas mecánica u osmóticamente para liberar el contenido citoplasmático en una disolución amortiguadora del pH. A continuación, el péptido se aísla de esta disolución. Seguidamente, puede conseguirse la purificación del péptido de la disolución usando una variedad de técnicas. Si el péptido ha sido sintetizado tal que contiene una etiqueta tal como hexahistidina u otros pequeños péptidos tanto en su término carboxilo como en su término amino, puede purificarse en un procedimiento de una única etapa pasando la disolución a través de una columna de afinidad en la que la matriz de la columna tiene una alta afinidad por la etiqueta o por el péptido directamente (es decir, un anticuerpo monoclonal). Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad al níquel, por tanto puede usarse para la purificación una columna de afinidad de níquel (tal como las columnas de níquel Qiagen) (véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1994).

35 Por otra parte, cuando el péptido no tiene ninguna etiqueta no es práctico usar un anticuerpo para purificar el péptido, y pueden usarse otros procedimientos bien conocidos para purificar. Tales procedimientos incluyen, sin limitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, HPLC, electroforesis nativa en gel en combinación con elución por gel y electroforesis isoeléctrica preparativa (máquina/técnica "Isoprime", Hoefer Scientific).
 40 En algunos casos, pueden combinarse dos o más de estas técnicas para conseguir una mayor pureza.

45 Si se anticipa que el péptido se encontrará principalmente en el espacio periplasmático de la bacteria o en el citoplasma de células eucariotas, puede extraerse el contenido del periplasma o del citoplasma, incluyendo cuerpos de inclusión (por ejemplo, bacterias Gram negativas) si el péptido procesado ha formado tales complejos, de la célula huésped usando cualquier técnica estándar conocida por los expertos. Por ejemplo, las células huésped pueden lisarse para liberar el contenido del periplasma mediante el uso de una prensa francesa, homogeneización y/o sonicación. El homogeneizado puede entonces centrifugarse.

6.3.4. Agentes inhibidores de anticuerpos IgM naturales

50 Los agentes inhibidores de IgM también pueden ser anticuerpos que compiten con IgMs naturales en la unión al antígeno. Los métodos para producir anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo monoclonal frente a una diana (por ejemplo, una inmunoglobulina patógena o un antígeno específico de la isquemia en una célula) mediante una variedad de técnicas, que incluyen la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Aunque en principio se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo transformación vírica u oncogénica de linfocitos B.
 55 El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. En la técnica se conocen protocolos de inmunización y técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión. También son conocidos socios de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

Pueden generarse anticuerpos monoclonales de ser humano usando ratones transgénicos que portan los genes de inmunoglobulinas de ser humano en lugar de los genes de inmunoglobulinas de ratón. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés se usan para producir hibridomas que secretan mAbs de ser humano con afinidades específicas para epítopes de una proteína de ser humano (véase, por ejemplo, Word et al. Solicitud Internacional WO 91/00906, Kucherlapati et al., publicación PCT WO 91/10741; Lonberg et al. Solicitud Internacional WO 92/03918; Kay et al. Solicitud Internacional 92/03917; Lonberg N. et al. 1994 Nature 368: 856-859; Green L.L. et al. 1994 Nature Genet. 7: 13-21; Morrison S.L. et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855; Bruggeman et al. 1993 Year Immuno. 17: 33-40; Tuailon et al. 1993 PNAS 90: 3720-3724; Bruggeman et al. 1991 Eur. J. Immunol. 21: 1323-1326). En una realización, pueden generarse hibridomas de células CD5+, B1 de ser humano. Alternativamente, pueden usarse hibridomas murinos "humanizados" que reconozcan el "antígeno isquémico" de reactividad cruzada.

También pueden generarse anticuerpos monoclonales por otros métodos conocidos por los expertos en la técnica de la tecnología del DNA recombinante. SE ha desarrollado un método alternativo, referido como el método de "expresión combinatoria de anticuerpos" para identificar y aislar fragmentos de anticuerpos que tienen una especificidad particular por el antígeno, y pueden utilizarse para producir anticuerpos monoclonales (para descripciones de la expresión combinatoria de anticuerpos véase por ejemplo, Sastry et al. 1989 PNAS 86: 5, 728; Huse et al. 1989 Science 246: 1275; y Orlando et al. 1989 PNAS 86: 3833). Después de inmunizar a un animal con un inmunógeno como se describió anteriormente, el repertorio de anticuerpos del conjunto resultante de células B se clona. En general, se conocen métodos para obtener la secuencia de DNA de las regiones variables de una población diversa de moléculas de inmunoglobulinas usando una mezcla de cebadores oligómeros y PCR. Por ejemplo, para la amplificación por PCR de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de varios anticuerpos murinos pueden usarse cebadores oligonucleótidos mixtos que corresponden a las secuencias líder del extremo 5' (péptido señal) y/o las secuencias marco 1 (FR1), así como un cebador para una región constante conservada del extremo 3' (Larrick et al., 1991, *Biotechniques* 11: 152-156). También puede usarse una estrategia similar para amplificar las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de ser humano de anticuerpos de ser humano (Larrick et al., 1991, *Methods: Companion to Methods in Enzymology* 2: 106-110).

En una realización ilustrativa, se aísla RNA de linfocitos B, por ejemplo células de la sangre periférica, médula ósea o preparaciones del bazo, usando protocolos estándar (por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.683.202; Orlando et al. PNAS (1989) 86: 3833-3837; Sastry et al., PNAS (1989) 86: 5728-5732; y Huse et al. (1989) *Science* 246: 1275-1281). Se sintetiza la primera hebra de cDNA usando cebadores específicos para la región constante de la o las cadenas pesadas y cada una de las cadenas ligeras κ y λ , así como cebadores para secuencia señal. Usando cebadores PCR de la región variable se amplifican las regiones variables tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras, cada una sola o en combinación, y se ligan a vectores apropiados para la posterior manipulación para generar los paquetes de expresión. Los cebadores oligonucleótidos en protocolos de expresión pueden ser únicos o degenerados o incorporar inosina en posiciones degeneradas. También pueden incorporarse en los cebadores secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción para permitir el clonado del fragmento amplificado en un vector en un marco de lectura predeterminado para la expresión.

La biblioteca V-gen del repertorio de anticuerpos derivados por inmunización puede expresarse mediante una población de paquetes de expresión, preferiblemente derivados de fagos filamentosos; para formar una biblioteca de expresión en fagos. Idealmente, el paquete de expresión comprende un sistema que permite el muestreo de bibliotecas de expresión muy grandes de anticuerpos variegados, la clasificación rápida después de cada ronda de separación por afinidad, y el aislamiento fácil del gen del anticuerpo a partir de paquetes de expresión purificados. Además de kits comercialmente disponibles para generar bibliotecas de expresión en fagos (por ejemplo, *The Pharmacia Recombinant Phage Antibody System*, nº de catálogo 27-9400-01; y el kit de expresión en fagos Stratagene SurfZAPTM, nº de catálogo 240612), ejemplos de métodos y reactivos particularmente susceptibles de usar en la generación de una biblioteca de expresión de anticuerpos variegados pueden encontrarse en, por ejemplo, Ladner et al., patente de EE.UU. nº 5.223.409, Kang et al., Publicación Internacional nº WO 92/18619; Dower et al. Publicación Internacional nº WO 91/17271; Winter et al., Publicación Internacional nº WO 92/20791; Markland et al., Publicación Internacional nº WO 92/15679; Breitling et al., Publicación Internacional nº WO 93/01288; McCafferty et al., Publicación Internacional nº WO 92/01047; Garrard et al., Publicación Internacional nº WO 92/09690; Ladner et al., Publicación Internacional nº WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay et al. (1992) *Human Antibody Hybridomas* 3: 81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246: 1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12: 725-734; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226: 889-896; Clackson et al. (1991) *Nature* 352: 624-628; Gram et al. (1992) *PNAS* 89: 3576-3580; Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9: 1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc. Acid Res.* 19: 4133-4137; y Barbas et al. (1991) *PNAS* 88: 7978-7982.

En ciertas realizaciones, los dominios de la región V de las cadenas ligeras y pesadas pueden expresarse en el mismo polipéptido, unido por un conector flexible para formar un fragmento Fv de cadena única, y el gen scFV subsiguientemente clonado en el vector de expresión o genoma de fago deseado. Como se describe en general en McCafferty et al., *Nature* (1990) 348: 552-554, los dominios V_H y V_L completos de un anticuerpo, unidos por un conector flexible (Gly₄-Ser)₃ pueden usarse para producir un anticuerpo de cadena única que puede hacer que el paquete de expresión sea separable sobre la base de la afinidad por el antígeno. Los anticuerpos scFV aislados inmunorreactivos con el antígeno pueden subsiguientemente formularse en una preparación farmacéutica para usar en el método objeto.

Una vez mostrada en la superficie de un paquete de expresión (por ejemplo, un fago filamentoso), la biblioteca de anticuerpos se explora con el antígeno, o un fragmento péptido del mismo, diana para identificar y aislar paquetes que expresen un anticuerpo que tenga especificidad por el antígeno diana. El ácido nucleico que codifica el anticuerpo seleccionado puede recuperarse del paquete de expresión (por ejemplo, del genoma de un fago) y subclonarse en otros vectores de expresión mediante técnicas de DNA recombinante.

Las moléculas de anticuerpos específicos con altas afinidades por una proteína superficial pueden fabricarse según métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, métodos que implican la exploración de bibliotecas (Ladner, R.C., et al., patente de EE.UU. 5.233,409; Ladner, R.C., et al., patente de EE.UU. 5.403.484). Además, estas bibliotecas pueden usarse en exploraciones para obtener determinantes de unión que son compuestos que mimetizan a los determinantes estructurales de anticuerpos.

En particular, la superficie de unión de Fv de una molécula de un anticuerpo particular interacciona con su ligando diana según los principios de las interacciones proteína-proteína, por lo tanto pueden usarse datos de secuencias de V_H y V_L (el último de los cuales puede ser del tipo cadena κ o λ) en técnicas de diseño de proteínas conocidas por los expertos en la técnica. Pueden obtenerse detalles de la superficie de la proteína que comprende los determinantes de unión a partir de la información de secuencias de anticuerpos, mediante un procedimiento de modelado que usa estructuras tridimensionales previamente determinadas a partir de otros anticuerpos obtenidos de estudios de RMN o datos cristalográficos. Véase por ejemplo Bajorath, J. y S. Sheriff, 1996, *Proteins: Struct., Funct. and Genet.* 24(2), 152-157; Webster, D.M. y A.R. Rees, 1995, "Molecular modeling of antibody-combining sites" en S. Paul, Ed., *Methods in Molecular Biol.* 51, Antibody Engineering Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, pp 17-49; y Johnson, G. Wu, T.T. y E.A. Kabat, 1995, "Seqhunt: A program to screen aligned nucleotide and amino acid sequences", en *Methods in Molecular Biol.* 51, *op. cit.*, pp 1-15.

En una realización, se expresa un biblioteca de un péptido variegado mediante una población de paquete de expresión para formar una biblioteca de expresión de péptidos. Idealmente, el paquete de expresión comprende un sistema que permite el muestreo de bibliotecas muy grandes de expresión de péptidos variegados, la clasificación rápida después de cada ronda de separación por afinidad y el aislamiento fácil del gen que codifica al péptido a partir de paquetes de expresión purificados. Las bibliotecas de expresión de péptidos pueden estar en, por ejemplo, organismos procariontes y virus, los cuales pueden amplificarse rápidamente, son relativamente fáciles de manipular, y permiten la creación de un gran número de clones. Los paquetes de expresión preferidos incluyen, por ejemplo, células bacterianas vegetativas, esporas bacterianas, y más preferiblemente, virus bacterianos (especialmente virus de DNA). Sin embargo, la presente invención también contempla el uso de células eucariotas, que incluyen levaduras y sus esporas, como paquetes de expresión potenciales. Las bibliotecas de expresión en fagos se describieron anteriormente.

Otras técnicas incluyen cromatografía de afinidad con un "receptor" apropiado, por ejemplo, un antígeno diana, seguida por la identificación de los agentes o ligandos de unión aislados mediante técnicas convencionales (por ejemplo, espectrometría de masas y RMN). Preferiblemente, el receptor soluble está conjugado con un marcador (por ejemplo, fluoróforos, enzimas colorimétricos, radioisótopos o compuestos luminiscentes) que puede detectarse para indicar la unión al ligando. Alternativamente, pueden liberarse selectivamente compuestos inmovilizados y permitir que difundan a través de una membrana para que interaccionen con un receptor.

También pueden sintetizarse bibliotecas combinatorias de compuestos con "etiquetas" para codificar la identidad de cada miembro de la biblioteca (véase, por ejemplo, W.C. Still et al., Solicitud Internacional WO 94/08051). En general, este método se caracteriza por el uso de etiquetas inertes pero fácilmente detectables que están unidas al soporte sólido o a los compuestos. Cuando se detecta un compuesto activo, la identidad del compuesto se determina por identificación de la etiqueta única que lo acompaña. Este método de etiquetado permite la síntesis de grandes bibliotecas de compuestos que pueden identificarse a muy bajas concentraciones entre la serie total de todos los compuestos de la biblioteca.

Un anticuerpo de la presente invención puede ser uno en el cual la región variable, o una porción de la misma, por ejemplo, las regiones que determinan la complementariedad (CDR o CDRs), se genera en un organismo no humano, por ejemplo, una rata o un ratón. Los anticuerpos quimera, injertados en CDR y humanizados, están dentro de la invención. Los anticuerpos generados en un organismo no humano, por ejemplo, una rata o un ratón, y luego modificados, por ejemplo, en el marco variable o en la región constante, para disminuir la antigenicidad en un ser humano están dentro de la invención. Cualquier modificación está dentro del alcance de la invención en tanto y cuanto el anticuerpo tenga al menos una porción de unión al antígeno.

Los anticuerpos quimera (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón-ser humano) pueden producirse por técnicas de DNA recombinante conocidas en la técnica. Por ejemplo, se digiere un gen que codifica la región constante Fc de una molécula de anticuerpo monoclonal murino (o de otra especie) con enzimas de restricción para separar la región que codifica la Fc de murino, y se sustituye la porción equivalente de un gen que codifica una región constante Fc de ser humano (véase Robinson et al., Publicación de Patente Internacional PCT/US86/02269; Akira et al., Solicitud de Patente Europea 173.494; Neuberger et al., Solicitud Internacional WO 86/01533; Cabilly et al., Patente de EE.UU. n° 4.816.567; Cabilly et al., Solicitud de Patente Europea 125.023; Better et al. (1988 *Science* 240: 1041-1043); Liu et al. (1987) PNAS 84: 3439-3443; Liu et al., 1987, *J. Immunol.* 139: 3521-3526; Sun et al. (1987) PNAS 84: 214-218; Nishimura et al.,

1987, *Canc. Res.* 47: 999-1005; Word et al. (1985) *Nature* 314: 446-449; y Shaw et al., 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559).

5 Además, un anticuerpo quimera puede humanizarse reemplazando secuencias de la región variable Fv que no están directamente implicadas en la unión al antígeno con secuencias equivalentes de regiones variables Fv de ser humano. Métodos generales para generar anticuerpos humanizados son dados por Morrison, S.L., 1985, *Science* 229: 1202-1207, por Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4: 214, y por Queen et al., documentos US 5.585.089, US 5.693.761 y US 5.693.762.

10 Esos métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican todo o parte de las regiones variables Fv de inmunoglobulinas a partir de al menos una de una cadena pesada o ligera. Las fuentes de tales ácidos nucleicos son bien conocidas por los expertos en la técnica y, por ejemplo, pueden obtenerse a partir de un hibridoma que produzca anticuerpos 7E3 y anti-GPIIb/IIIa. El DNA recombinante que codifica al anticuerpo quimera, o un fragmento del mismo, puede entonces clonarse en un vector de expresión apropiado. Alternativamente, pueden producirse anticuerpos humanizados adecuados por sustitución CDR. Patente de EE.UU. 5.225.539; Jones et al. 1986 *Nature* 321: 552-525; Verhoeyan et al. 1988 *Science* 239: 1534; y Beidler et al. 1988 *J. Immunol.* 141: 4053-4060.

15 Pueden producirse anticuerpos humanizados o injertados en una CDR por injerto en una CDR o sustitución en una CDR, en las que pueden reemplazarse una, dos o todas las CDRs de una cadena de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.225.539; Jones et al. 1986 *Nature* 321: 552-525; Verhoeyan et al. 1988 *Science* 239: 1534; Beidler et al. 1988 *J. Immunol.* 141: 4053-4060; Winter, documento US 5.225.539.

20 Winter describe un método de injerto en una CDR que puede usarse para preparar los anticuerpos humanizados de la presente invención (solicitud de patente UK GB 2188638A, registrada en 26 de marzo de 1987; Winter, documento US 5.225.539).

25 Un anticuerpo humanizado o injertado en una CDR al menos tendrá una o dos, pero generalmente todas las CDRs receptoras (o cadenas pesadas y/o ligeras de la inmunoglobulina) reemplazadas por una CDR de un donante. Preferiblemente, el donante será un anticuerpo de roedor, por ejemplo, un anticuerpo de rata o de ratón, y el receptor será un marco de ser humano o un marco consenso de ser humano. Típicamente, a la inmunoglobulina que proporciona las CDRs se la llama la "donante" y a la inmunoglobulina que proporciona el marco se la llama la "acceptor(a)". En una realización, la inmunoglobulina donante no es de ser humano (por ejemplo, es de roedor). El marco acceptor puede ser un marco que se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, un ser humano) o un marco consenso, o una secuencia que aproximadamente es 85% o mayor, preferiblemente 90%, 95%, 99% o mayor, idéntica al mismo.

30 Todas las CDRs de un anticuerpo particular pueden ser reemplazadas por al menos una porción de una CDR no humana o sólo parte de las CDRs pueden ser reemplazadas por CDRs no humanas. Sólo es necesario reemplazar el número de CDRs requerido para la unión del anticuerpo humanizado al receptor Fc.

35 También están dentro del alcance de la invención anticuerpos humanizados y quimera en los cuales se han sustituido, suprimido o añadido aminoácidos específicos. En particular, los anticuerpos humanizados específicos tienen sustituciones de aminoácidos en la región marco, con el fin de mejorar la unión al antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado tendrá residuos en el marco idénticos al residuo del marco del donante u otro aminoácido diferente del residuo del marco del receptor. Como otro ejemplo, en un anticuerpo humanizado que tenga CDRs de ratón, los aminoácidos localizados en la región marco de ser humano pueden ser reemplazados por los aminoácidos localizados en las correspondientes posiciones del anticuerpo de ratón. Se sabe que en algunos casos tales sustituciones mejoran la unión de los anticuerpos humanizados al antígeno.

40 Los fragmentos de anticuerpos de la invención se obtienen usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la digestión de un anticuerpo con pepsina da fragmentos F(ab')₂ y múltiples pequeños fragmentos. La reducción con mercapto-etanol de un anticuerpo da cadenas pesadas y ligeras individuales. La digestión de un anticuerpo con papaína da fragmentos Fab individuales y el fragmento Fc.

45 En otro aspecto, la invención también caracteriza una inmunoglobulina natural modificada, la cual, por ejemplo, funciona como un agonista (compuesto mimético) o como un antagonista. Preferiblemente, la inmunoglobulina natural modificada, por ejemplo, una inmunoglobulina patógena modificada, funciona como un antagonista de la activación del complemento. Pueden generarse variantes de la inmunoglobulina patógena por mutagénesis, por ejemplo, mutación puntual discreta, la inserción o supresión de secuencias o el truncamiento de una inmunoglobulina patógena. Un agonista de la inmunoglobulina natural puede sustancialmente retener las mismas, o una subserie de, actividades biológicas de la forma de la proteína que se encuentra en la naturaleza. Un antagonista de una inmunoglobulina natural puede inhibir una o más actividades de la forma de la inmunoglobulina patógena que se encuentra en la naturaleza siendo, por ejemplo, capaz de unirse a un antígeno específico de la isquemia, pero incapaz de activar una ruta del complemento. Por tanto, pueden provocarse efectos biológicos específicos mediante un tratamiento con una variante de función limitada.

55 En una realización, el sitio dentro de la inmunoglobulina natural (por ejemplo, una IgM patógena) que se une a C1q puede hacerse mutar tal que no sea ya capaz de unirse a C1q. Por ejemplo, el dominio CH2 de una IgG y el dominio

CH4 de una IgM, que se sabe que contienen sitios de unión a C1q, pueden hacerse mutar (véase el documento WO 94/29351). Por ejemplo, puede hacerse mutar la mitad carboxilo terminal del dominio CH2 de una IgG (residuos 231 a 239, preferiblemente dentro de 234 a 239), la cual parece que media la unión a C1q y la subsiguiente activación del complemento. Como otro ejemplo, Wright et al. han demostrado que un cambio de un solo nucleótido en el dominio de la región constante de IgM hace que el anticuerpo sea defectuoso para iniciar la citólisis dependiente del complemento. El cambio de un solo nucleótido da lugar a la codificación de un residuo de serina, en lugar del residuo normal de prolina, en la posición aminoácida 436 en el tercer dominio constante (Wright et al. 1988, *J. Biol. Chem.* 263: 11221). Las sustituciones de aminoácidos que pueden hacerse a los anticuerpos con el fin de alterar la unión al o la actividad del complemento son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Wright et al. 1988, *J. Biol. Chem.* 263: 11221; Shulman et al. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7678-7682; Arya et al., (1994) *J. Immunol.* 253: 1206-1212; Poon et al., (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 8571-8577). Por consiguiente, en una realización, los anticuerpos de la presente invención tienen una mutación que altera la unión al o la actividad del complemento. En la presente memoria, a los anticuerpos en los que se han añadido, suprimido o sustituido aminoácidos se les denomina anticuerpos modificados o alterados. Como apreciará un experto en la técnica, los métodos usados para provocar tales cambios en la secuencia nucleotídica o aminoácida variarán dependiendo de los resultados deseados.

Pueden identificarse variantes de una inmunoglobulina natural explorando bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo mutantes de truncamiento, de una inmunoglobulina natural respecto a su actividad agonista o antagonista.

Para generar una población variegada de fragmentos para la exploración y subsiguiente selección de variantes de esta proteína pueden usarse bibliotecas de fragmentos, por ejemplo, fragmentos N-terminales, C-terminales o internos, de una secuencia que codifica a una inmunoglobulina natural. Son particularmente preferidas las variantes en las que se añade o suprime un residuo de cisteína o en las que se añade o suprime un residuo que está glicosilado.

Métodos para seleccionar productos genéticos de bibliotecas combinatorias fabricadas por mutaciones puntuales o por truncamiento, y para explorar en bibliotecas de cDNA productos genéticos que tengan una propiedad seleccionada. Para identificar variantes puede usarse, en combinación con los ensayos de exploración-selección, la mutagénesis de ensamble recursivo (REM), una técnica que acrecienta la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas (Arkin y Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7811-7815; Delgrave et al. (1993) *Protein Engineering* 6(3): 327-331).

Para analizar una biblioteca variegada pueden explotarse ensayos basados en células. Por ejemplo, una biblioteca de vectores de expresión puede transfectarse en una línea celular, por ejemplo, una línea celular que normalmente a la proteína de una manera dependiente del sustrato. Puede entonces recuperarse un DNA plásmido de las células que se califican respecto a la inhibición, o alternativamente, la potenciación de la transmisión de señales mediante el complejo inmunoglobulina patógena-sustrato, y además se caracterizan los clones individuales.

La invención también caracteriza un método para fabricar una inmunoglobulina natural, por ejemplo, una inmunoglobulina patógena que tenga una actividad diferente a la de la silvestre, por ejemplo, un antagonista, agonista o super agonista de una inmunoglobulina patógena que se encuentra en la naturaleza. El método incluye: alterar la secuencia de una inmunoglobulina natural, por ejemplo, por sustitución o supresión de uno o más residuos de una región, dominio o residuo no conservados, descritos en la presente memoria, y ensayar el polipéptido alterado respecto a la actividad deseada.

Además, la invención caracteriza un método para fabricar un fragmento o análogo de una inmunoglobulina natural, por ejemplo, una inmunoglobulina patógena que tenga una actividad biológica alterada diferente a la de una inmunoglobulina patógena que se encuentra en la naturaleza. El método incluye: alterar la secuencia, por ejemplo, por sustitución o supresión de uno o más residuos, de una inmunoglobulina natural, por ejemplo, alterando la secuencia de una región, dominio o residuo no conservados, descritos en la presente memoria, y ensayar el polipéptido alterado respecto a la actividad deseada. En una realización ejemplo, la inmunoglobulina natural modificada puede tener una capacidad reducida para activar el complemento. Por ejemplo, pueden haberse mutado uno o más de los residuos aminoácidos implicados en la unión al complemento y/o la activación del complemento.

En cierta realización, el anticuerpo natural modificado puede comprender al menos la región CDR1 de SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 10), o porciones de la misma que se unan al antígeno, y/o al menos la región CDR2 de SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 12), o porciones de la misma que se unan al antígeno. El anticuerpo modificado puede adicionalmente comprender al menos la región CDR 1 de SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 4), o porciones de la misma que se unan al antígeno, y/o al menos la región CDR 2 de SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 6), o porciones de la misma que se unan al antígeno. En una realización ejemplo, el anticuerpo modificado comprende la región CDR 1 de SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 10) y la región CDR 2 de SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 12), o porciones de las mismas que se unan al antígeno. Los anticuerpos modificados también pueden comprender la región CDR 1 de SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 10) y la región CDR 2 de SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 12) y la región CDR 1 de SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 4) y la región CDR 2 de SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 6), o porciones de las mismas que se unan al antígeno.

El anticuerpo natural modificado puede ser un anticuerpo de ser humano que tenga una afinidad de unión por el antígeno específico de la isquemia, similar, por ejemplo, mayor que, menor que o igual que, a la afinidad de unión del anticuerpo producido por el hibridoma depositado con el ATTC, que tiene el número de acceso PTA-3507. En otra realización, el anticuerpo natural puede ser un anticuerpo no humano, por ejemplo, de vaca, cabra, ratón, rata, oveja,

cerdo o conejo. En una realización ejemplo, el anticuerpo no humano es un anticuerpo murino. El anticuerpo natural también puede ser un anticuerpo recombinante. En una realización ejemplo, el anticuerpo natural es un anticuerpo humanizado. El anticuerpo natural modificado puede ser un anticuerpo IgG o IgM. En otra realización, la inmunoglobulina natural aislada posee la misma especificidad antigénica que la inmunoglobulina producida por el hibridoma depositado con el ATTC, que tiene el número de acceso PTA-3507.

6.4. Ensayo de exploración para identificar agentes inhibidores adicionales

Pueden identificarse otros agentes inhibidores de una interacción entre un anticuerpo IgM natural y un antígeno o un componente de la ruta del complemento a partir de uno o más (por ejemplo, una pluralidad de) compuestos de ensayo, que comprende: (i) proporcionar una mezcla de reacción la cual incluya al anticuerpo IgM natural y al antígeno o el componente de la ruta del complemento en condiciones que permitan que ocurra la unión del anticuerpo IgM natural y del antígeno o del componente de la ruta del complemento; (ii) poner en contacto el anticuerpo IgM natural y el antígeno o el componente de la ruta del complemento con uno o más compuestos de ensayo (por ejemplo, miembros de una biblioteca combinatoria); y (iii) detectar cualquier cambio en la unión del anticuerpo IgM natural y el antígeno o el componente del complemento en presencia de un compuesto de ensayo dado en relación con el detectado en ausencia del compuesto de ensayo. Un cambio (por ejemplo, una disminución) del nivel de unión entre el anticuerpo IgM natural y el antígeno o el componente de la ruta del complemento en presencia del compuesto de ensayo en relación con el detectado en ausencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo es un agente inhibidor de la interacción entre el anticuerpo IgM natural y el antígeno o el componente de la ruta del complemento.

El método puede además incluir el pretratamiento de anticuerpos IgM naturales con uno o más compuestos de ensayo. Los anticuerpos IgM naturales pretratados pueden entonces inyectarse en ratones deficientes en inmunoglobulinas naturales.

En ciertas realizaciones, los métodos se realizan *in vitro*. En una realización ejemplo, la etapa de contacto se efectúa *in vivo*. En una realización ejemplo, el antígeno es miosina. En otras realizaciones, el antígeno es un tejido o lisado endotelial obtenido de un sujeto, por ejemplo un paciente humano con lesión por reperusión o isquemia. En otra realización ejemplo, el componente de la ruta del complemento es un componente de la ruta clásica del complemento. En una realización ejemplo adicional, el componente de la ruta del complemento es una molécula C1 o una subunidad de la misma (C1q).

En realizaciones ejemplo, el anticuerpo IgM natural o el antígeno (o ambos) se marcan con una señal detectable, por ejemplo, compuestos fluoróforos, enzimas colorimétricos, radioisótopos, compuestos luminiscentes, y compuestos semejantes. El método puede además incluir la repetición de al menos una etapa, por ejemplo, la etapa de entrar en contacto con un segundo o subsiguiente miembro o miembros de la biblioteca.

En una realización ejemplo, se ensaya una pluralidad de compuestos de ensayo. La pluralidad de compuestos de ensayo, por ejemplo, miembros de una biblioteca, puede incluir al menos 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 ó 10^8 compuestos. En una realización preferida, la pluralidad de compuestos de ensayo, por ejemplo, miembros de una biblioteca, comparten una característica estructural o funcional. El compuesto de ensayo puede ser un péptido o una pequeña molécula orgánica.

En una realización, el agente inhibidor es una pequeña molécula orgánica que puede identificarse en una librería combinatoria. En una realización, la invención proporciona bibliotecas de agentes inhibidores. La síntesis de bibliotecas combinatorias es bien conocida en la técnica y ha sido revisada (véanse, por ejemplo, E.M. Gordon et al., *J. Med. Chem.* (1994) 37: 1385-1401; DeWitt, S.H.; Czarnik, A.W. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29: 114; Armstrong, R.W.; Combs, A.P.; Tempest, P.A.; Brown, S.D.; Keating, T.A. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29: 123; Ellman, J.A. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29: 132; Gordon, E.M.; Gallop, M.A.; Patel, D.V. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29: 144; Lowe, G. *Chem. Soc. Rev.* (1995) 309; Blondelle et al. *Trends Anal. Chem.* (1995) 14: 83; Chen et al. *J. Am. Chem. Soc.* (1994) 116: 2661; Patentes de EE.UU. 5.359.115, 5.362.889 y 5.288.514; Publicaciones PCT n°s WO 92/10092, WO 93/09668, WO 91/07087, WO 93/20242, WO 94/08051).

Pueden prepararse bibliotecas de compuestos según una variedad de métodos, algunos de los cuales son conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede implantarse una estrategia de "dividir-juntar" de la siguiente forma: se colocan bolas de un soporte polímero funcionalizado en una pluralidad de depósitos de reacción; se conocen una variedad de soportes polímeros adecuados para la síntesis de péptidos en fase sólida, y algunos están comercialmente disponibles (para ejemplos véase, por ejemplo, M. Bodansky "Principles of Peptide Synthesis", 2ª edición, Springer-Verlag, Berlín (1993)). A cada parte alícuota de bolas se añade una disolución de un aminoácido activado diferente, y se permite que las reacciones transcurran para dar una pluralidad de aminoácidos inmovilizados, uno en cada depósito de reacción. A continuación, las partes alícuotas de bolas derivatizadas se lavan, se "juntan" (es decir, se recombinan) y el conjunto de bolas se divide de nuevo, colocándose cada parte alícuota en un depósito de reacción separado. A continuación, se añade otro aminoácido activado a cada parte alícuota de las bolas. El ciclo de síntesis se repite hasta que se obtiene la longitud deseada del péptido. Los residuos aminoácidos añadidos en cada ciclo de síntesis pueden seleccionarse aleatoriamente; alternatively, pueden seleccionarse aminoácidos para proporcionar una biblioteca "sesgada", por ejemplo, una biblioteca en la que ciertas porciones del agente inhibidor se seleccionan no aleatoriamente, por ejemplo, para dar un agente inhibidor que tenga una similitud u homología estructural conocida con un péptido conocido capaz de

interaccionar con un anticuerpo, por ejemplo, el sitio de unión antígeno anticuerpo anti-idiotípico. Se apreciará que de esta forma puede generarse fácilmente una amplia variedad de compuestos peptídicos, peptidomiméticos o no peptídicos.

5 La estrategia de “dividir-juntar” da lugar a una biblioteca de péptidos, por ejemplo, agentes inhibidores, los cuales pueden usarse para preparar una biblioteca de compuestos de ensayo. En otra síntesis ilustrativa, se crea una “biblioteca de diversómeros” por el método de Hobbs DeWitt et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909 (1993)). También pueden usarse otros métodos de síntesis, que incluyen la técnica del “saco de té” de Houghten (véase, por ejemplo, Houghten et al. *Nature* 354: 84-86 (1991)), para sintetizar bibliotecas de compuestos según la invención objeto. Pueden explorarse bibliotecas de compuestos para determinar si cualquier miembro de la biblioteca tiene una actividad deseada, u, si la tiene, identificar las especie activa. Se han descrito métodos para explorar bibliotecas combinatorias (véase, por ejemplo, Gordon et al., *J. Med. Chem.*, *supra*). Las bibliotecas de compuestos solubles pueden explorarse por cromatografía de afinidad con un receptor apropiado para aislar ligandos del receptor, seguido por identificación de los ligandos aislados por técnicas convencionales (por ejemplo, espectrometría de masas, RMN, y semejantes). Pueden explorarse compuestos inmovilizados poniendo en contacto los compuestos con un receptor soluble; preferiblemente, el receptor soluble se conjuga con un marcador (por ejemplo, compuestos fluoróforos, enzimas colorimétricos, radioisótopos, compuestos luminiscentes, y compuestos semejantes) que puede detectarse para indicar la unión al ligando. Alternativamente, pueden liberarse selectivamente compuestos inmovilizados y permitir que difundan a través de una membrana para que interaccionen con un receptor. A continuación, se describen ensayos ejemplo útiles para explorar las bibliotecas.

20 En una realización, pueden seleccionarse compuestos respecto a la capacidad para interaccionar con una inmunoglobulina natural ensayando la actividad de cada compuesto para unirse directamente a la inmunoglobulina o para inhibir una interacción entre la inmunoglobulina y un antígeno isquémico, por ejemplo, incubando el compuesto de ensayo con una inmunoglobulina y un lisado, por ejemplo, un lisado de células endoteliales, por ejemplo, en un pocillo de una placa de múltiples pocillos, tal como una placa estándar de microtitulación de 96 pocillos. En esta realización, puede determinarse la actividad de cada compuesto individual. Como testigo pueden usarse un o unos pocillos que no tengan ningún compuesto de ensayo. Después de la incubación, la actividad de cada compuesto de ensayo puede determinarse ensayando cada pocillo. Así, las actividades de una pluralidad de compuestos de ensayo pueden determinarse en paralelo.

6.5. Agentes inhibidores y preparaciones farmacéuticas y de diagnóstico

30 Los agentes inhibidores IgM pueden modificarse, por ejemplo para aumentar la solubilidad y/o facilitar la purificación, identificación, detección y/o caracterización estructural. Modificaciones ejemplo, incluyen, por ejemplo, la adición de: glutatona S-transferasa (GST), proteína A, proteína G, péptido de unión a la calmodulina, tioredoxina, proteína de unión a la maltosa, HA, myc, poliarginina, poli-His, poli-His-Asp o proteínas de fusión FLAG y etiquetas. En varias realizaciones, un agente inhibidor de IgM puede comprender una o más fusiones heterólogas. Por ejemplo, los péptidos pueden contener copias múltiples del mismo dominio de fusión o pueden contener fusiones de dos o más dominios diferentes. Las fusiones pueden ocurrir en el término N del péptido, en el término C del péptido, o en ambos. También está dentro del alcance de la invención incluir secuencias conectoras entre un péptido de la invención y el dominio de fusión con el fin de facilitar la construcción de la proteína de fusión o para optimizar la expresión de la proteína o restricciones estructurales de la proteína de fusión. En otra realización, el péptido puede construirse para que contenga sitios de escisión con proteasas entre el péptido de fusión y el péptido de la invención con el fin de separar la etiqueta después de la expresión de la proteína o posteriormente. Ejemplos de endoproteasas adecuadas incluyen, por ejemplo, las proteasas Factor Xa y TEV.

45 Las técnicas para fabricar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de DNA que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se realiza según técnicas convencionales, empleando para la ligadura terminales con extremos truncados o escalonados, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los terminales apropiados, relleno de extremos cohesivos cuando sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable y ligadura enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores automáticos de DNA. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de un gen puede llevarse a cabo usando cebadores de sujeción que den lugar a fragmentos complementarios que sobresalen entre dos fragmentos consecutivos del gen, los cuales pueden subsiguientemente templarse para generar una secuencia quimera del gen (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

50 Los agentes inhibidores de IgM pueden modificarse químicamente sobre la base de una unión a un polímero. El polímero es típicamente soluble en agua para que el agente inhibidor al que está unido no precipite en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. El polímero puede tener un único grupo reactivo, tal como un éster activo para acilar o un aldehído para alquilar, de modo que puede controlarse el grado de polimerización. Un aldehído reactivo preferido es polietilenglicol propionaldehído, el cual es estable en agua, o sus derivados mono-C1-C10-alcoxi o ariloxi (véase la patente de EE.UU. nº 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o no. Preferiblemente, para el uso terapéutico de la preparación del producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable. El polímero soluble en agua, o una mezcla del mismo si se desea, puede seleccionarse del grupo que consiste en, por ejemplo, polietilenglicol

(PEG), monometoxi-poli(etilenglicol), dextrano, celulosa o polímeros basados en otros carbohidratos, poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero óxido de propileno/óxido de etileno, polioles polietoxilados (por ejemplo, glicerol, y poli(alcohol vinílico).

5 Los agentes inhibidores de IgM pueden estar marcados, por ejemplo con un marcador isotópico para facilitar su detección usando resonancia magnética nuclear u otra técnica aplicable. Los marcadores isotópicos ejemplo incluyen marcadores radioisotópicos tales como, por ejemplo, potasio-40 (^{40}K), carbono-14 (^{14}C), tritio (^3H), azufre-35 (^{35}S), fósforo-32 (^{32}P), tecnecio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), talio-201 (^{201}Tl), galio-67 (^{67}Ga), indio-111 (^{111}In), yodo-123 (^{123}I), yodo-131 (^{131}I), itrio-90 (^{90}Y), samario-153 (^{153}Sm), renio-186 (^{186}Re), renio-188 (^{188}Re), disprosio-165 (^{165}Dy) y holmio-166 (^{166}Ho). El
10 marcador isotópico también puede ser un átomo con un spin nuclear diferente de cero, que incluyen, por ejemplo, hidrógeno-1 (^1H), hidrógeno-2 (^2H), hidrógeno-3 (^3H), fósforo-31 (^{31}P), sodio-23 (^{23}Na), nitrógeno-14 (^{14}N), nitrógeno-15 (^{15}N), carbono-13 (^{13}C) y flúor-19 (^{19}F). En ciertas realizaciones, el agente inhibidor es uniformemente marcado con un marcador isotópico, por ejemplo, en el que al menos está marcado 50%, 70%, 80%, 90%, 95% ó 98% del agente inhibidor. En otras realizaciones, el marcador isotópico está localizado en una o más localizaciones específicas dentro del agente inhibidor, por ejemplo, el marcador puede estar específicamente incorporado en uno o más de los residuos de leucina de un péptido. Un agente inhibidor individual puede comprender dos o más marcadores isotópicos diferentes, por ejemplo, un péptido puede comprender tanto marcaje con ^{15}N como con ^{13}C .

Los agentes inhibidores pueden marcarse con un marcador fluorescente. En una realización ejemplo, un agente inhibidor se fusiona con una secuencia homóloga de un polipéptido la cual produce una señal fluorescente detectable, incluyendo, por ejemplo, la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína verde fluorescente reforzada (EGFP), la proteína verde fluorescente de *Renilla reniformis*, GFPmut2, GFPuv4, la proteína amarilla fluorescente reforzada (EYFP), la proteína cian fluorescente reforzada (ECPF), la proteína azul fluorescente reforzada (ECPF), citrina y la proteína roja fluorescente de discosoma (dsRED).
20

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes inhibidores de anticuerpos naturales que incluyen péptidos que se unen a anticuerpos IgM naturales o anticuerpos IgM naturales modificados puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar el LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y el ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren agentes inhibidores de anticuerpos naturales que exhiben grandes efectos terapéuticos. Aunque pueden usarse agentes inhibidores de anticuerpos naturales o péptidos que se unen a anticuerpos naturales que exhiben efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado para diseñar un sistema de administración que tenga como objetivo tales péptidos o anticuerpos modificados en el sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.
25 30

Los datos obtenidos de los ensayos con cultivos celulares y estudios de animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para usar en seres humanos. La dosificación de un agente inhibidor de anticuerpos naturales o de péptidos que se unen a anticuerpos naturales cae preferiblemente dentro del intervalo de las concentraciones circulantes que incluyen el ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. Para cualquier agente inhibidor o péptido usado en la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede inicialmente estimarse a partir de ensayos de cultivos celulares. Puede formularse una dosis en modelos de animales para conseguir un intervalo de concentraciones circulantes en el plasma que incluye el IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición de los síntomas mitad de la máxima) que se determina en el cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar más exactamente las dosis útiles en seres humanos. Las concentraciones en el plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía de líquidos de alta resolución.
35 40

En otra realización, se administra un único bolo de un agente inhibidor de anticuerpos naturales, que incluye un péptido que se une a anticuerpos IgM naturales y anticuerpos IgM naturales modificados, antes de, a la vez que, o después de la lesión del tejido. Típicamente, una inyección de una única dosis se dará unas pocas horas, unos pocos días o unas pocas semanas después de la lesión del tejido. La presente invención está en parte basada en el descubrimiento de que un agente inhibidor de anticuerpos IgM naturales previene la lesión por reperusión. Una única administración de una dosificación unitaria puede ser inmediatamente adyacente al sitio de la lesión o puede ser, por ejemplo, en una vena que drene o fluya por el sitio de la lesión.
45 50

Un agente inhibidor de anticuerpos IgM naturales, tal como un péptido que se une a anticuerpos IgM naturales o un anticuerpo IgM natural modificado se administra inicialmente en un momento de tiempo anterior al tiempo del daño del órgano o tejido diana. Este puede ser un enfoque útil en sujetos en los que se ha determinado que están en riesgo de sufrir una lesión por reperusión, tales como aquellos con un historial de lesión por reperusión o aquellos intervenidos quirúrgicamente.
55

En aún otra realización, un único bolo de un agente inhibidor de anticuerpos IgM naturales puede ser seguido por administraciones secuenciales de un agente inhibidor de anticuerpos IgM naturales como infusiones continuas o administraciones adicionales de un único bolo. El agente inhibidor puede administrarse en exposiciones secuenciales durante un período de horas, días, semanas, meses o años. Además, se contempla que agentes terapéuticos

adicionales pueden combinarse con, administrarse antes de o después de la administración de un péptido que se une a anticuerpos naturales u otro agente inhibidor de anticuerpos naturales. Otros agentes terapéuticos que pueden administrarse con un agente inhibidor de anticuerpos IgM naturales incluyen, pero no se limitan a, agentes anti-coagulación y agentes inhibidores del complemento.

5 Los agentes inhibidores objeto pueden proporcionarse en vehículos farmacéuticamente aceptables o formularse para una variedad de modos de administración, que incluyen la administración sistémica y tópica o localizada. En general, las técnicas y las formulaciones pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton PA. En ciertas realizaciones, el agente inhibidor se proporciona para la administración transmucosal o transdérmica. Para tal administración, en la formulación con el polipéptido se usan agentes de penetración apropiados para la barrera a permear. Tales agentes de penetración son en general conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, sales biliares y derivados de ácido fusídico para la administración transmucosal. Además, para facilitar la permeación pueden usarse detergentes. La administración transmucosal puede ser por medio de pulverizadores nasales o usando supositorios. Para la administración tópica, los agentes inhibidores de la invención se formulan en ungüentos, bálsamos, geles o cremas como en general se conoce en la técnica.

15 Las composiciones farmacéuticas según la invención se preparan produciendo agentes inhibidores de anticuerpos IgM naturales en una forma para administración adecuada para un sujeto usando vehículos, excipientes y aditivos o compuestos auxiliares. Los vehículos o compuestos auxiliares frecuentemente usados incluyen carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, talco, proteínas de la leche, gelatina, almidón, vitaminas, celulosa y sus derivados, aceites vegetales y animales, polietilenglicoles y disolventes, tales como agua estéril, alcoholes, glicerol y alcoholes polihídricos. Los vehículos intravenosos incluyen fluidos y reforzadores de nutrientes. Los agentes conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, agentes conservantes, disoluciones amortiguadoras del pH y semejantes, como, por ejemplo, se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ava edición Easton: Mack Publishing Co., 1405-1412, 1461-1487 (1975) y The National Formulary XIV, 14ava ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975).

El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan según procedimientos rutinarios en la técnica. Véase Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics (7ª Ed.).

30 Las composiciones farmacéuticas se preparan y administran preferiblemente en dosis unitarias. Las dosis unitarias sólidas son comprimidos, cápsulas y supositorios e incluyen, por ejemplo, cápsulas de geles de liberación dependiente del pH basadas en alginatos. Para el tratamiento de un sujeto son necesarias diferentes dosis diarias dependiendo de la actividad del compuesto, la manera de administración, la naturaleza y gravedad del trastorno, la edad y el peso corporal del sujeto. Sin embargo, en ciertas circunstancias pueden ser apropiadas dosis diarias mayores o menores. La administración de la dosis diaria puede llevarse a cabo tanto mediante una única administración en forma de una dosis unitaria individual o mediante varias dosis unitarias más pequeñas y también por administración múltiple de dosis subdivididas a intervalos específicos.

40 Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden administrarse local o sistémicamente en una dosis terapéuticamente efectiva. Desde luego, las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del peso y estado general del sujeto. Como se trató anteriormente, las dosificaciones usadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil en las cantidades útiles para la administración *in situ* de la composición farmacéutica, y pueden usarse modelos animales para determinar las dosificaciones efectivas para el tratamiento de trastornos particulares. Varias consideraciones se describen en, por ejemplo, Larger, Science, 249: 1527 (1990); Gilman et al. (Eds.) (1990).

45 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica útil para administrar a un sujeto que necesite de tal tratamiento un péptido que se une a anticuerpos naturales. La "administración" de la composición farmacéutica de la invención puede conseguirse por cualquier medio conocido por un experto. Preferiblemente, un "sujeto" se refiere a un mamífero, mucho más preferiblemente un ser humano.

50 Los agentes inhibidores de anticuerpos IgM naturales pueden administrarse parenteralmente, entéricamente, por inyección, infusión rápida, absorción nasofaríngea, absorción dérmica, rectal y oralmente. Las preparaciones de vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles o acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Pueden usarse vehículos para apósitos oclusivos para aumentar la permeabilidad de la piel y reforzar la absorción del antígeno. Las formas líquidas de dosificación para la administración oral pueden en general comprender una disolución de liposomas que contenga la forma líquida de dosificación. Formas adecuadas de preparaciones farmacéuticas sólidas o líquidas son, por ejemplo, gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, aerosoles, gotas o disoluciones inyectables en forma de ampollas y también preparaciones con liberación prolongada de compuestos activos, en cuya preparación se usan excipientes y aditivos y/o compuestos auxiliares tales como agentes desintegrantes, agentes ligantes, agentes de revestimiento, agentes de

hinchamiento, lubricantes, saborizantes, edulcorantes y elixires que contienen diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como agua purificada. Cuando la enfermedad o el trastorno es un trastorno gastrointestinal se prefieren formulaciones orales o en forma de supositorios.

5 Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando un péptido que se une a anticuerpos naturales en la cantidad requerida (por ejemplo, aproximadamente 10 µg a aproximadamente 10 mg/kg) en un disolvente apropiado y a continuación esterilizando, tal como mediante filtración estéril. Además, pueden prepararse polvos por técnicas estándar tales como liofilización o secado a vacío.

10 En otra realización, se prepara un agente inhibidor de anticuerpos IgM naturales con un vehículo biodegradable de características de liberación sostenida para la liberación sostenida en el tracto gastrointestinal o para implantar el órgano diana con características de liberación a largo plazo del agente activo en el sitio de actividad pretendido. Los polímeros biodegradables incluyen, por ejemplo, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico) poli(ácido láctico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido acético). También puede usarse una formulación liposomal.

15 Otro medio de administrar un agente inhibidor de anticuerpos IgM naturales (por ejemplo, un péptido que se une a anticuerpos IgM naturales) es administrando a un sitio o tejido que necesita reparación células huésped que expresan péptidos que se unen a anticuerpos naturales. Alternativamente, las células pueden administrarse en unión de varios vehículos de administración, que incluyen esponjas biocompatibles biodegradables o no biodegradables (por ejemplo, colágeno u otros materiales de matrices extracelulares), algodón, poli(ácido glicólico), suturas para cortes intestinales, celulosa, gelatina, dextrano, poliamidas, un poliéster, un poliestireno, un polipropileno, un poliacrilato, un polivinilo, un policarbonato, un politetrafluoroetileno, o un compuesto de nitrocelulosa formado en una estructura tridimensional (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU: n° 5.858.721 de Naughton et al.).

20 Puede usarse cualquier ruta de administración compatible con el principio activo. La preferida es la administración parenteral, tal como por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa. La dosis del ingrediente activo a administrar depende de la base de las prescripciones médicas según la edad, el peso y la respuesta individual del paciente.

25 La dosificación diaria no ponderada para el paciente puede estar entre aproximadamente 2,5-5,0 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 2,5-3,0 mg/kg, aproximadamente 3,0-3,5 mg/kg, aproximadamente 3,5-4,0 mg/kg, aproximadamente 4,0-4,5 mg/kg y aproximadamente 4,5-5,0 mg/kg.

30 La composición farmacéutica para administración parenteral puede prepararse en una forma inyectable que comprenda el principio activo y un vehículo adecuado. Los vehículos para la administración parenteral son bien conocidos en la técnica y comprenden, por ejemplo, agua, disolución salina, disolución de Ringer y/o dextrosa.

El vehículo puede contener pequeñas cantidades de excipientes con el fin de mantener la estabilidad e isotonicidad de la preparación farmacéutica.

La preparación de las citadas disoluciones puede llevarse a cabo según las modalidades ordinarias.

35 La presente invención se ha descrito con referencia a las realizaciones específicas, pero el contenido de la descripción comprende todas las modificaciones y sustituciones que puede llevar a cabo una persona experta en la técnica sin extender más allá del significado y el fin de las reivindicaciones. Si se desea, las composiciones pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina metálica o de plástico, tal como un envase tipo ampolla. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para la administración.

40 *6.6. Enfermedades y afecciones que pueden tratarse con agentes inhibidores de anticuerpos IgM naturales*

Los agentes de inhibidores de IgM, tales como los péptidos que se unen a anticuerpos IgM naturales o los anticuerpos IgM naturales modificados, pueden usarse para tratar varias enfermedades y afecciones inflamatorias que son desencadenadas por la unión de anticuerpos IgM naturales. Por ejemplo, los agentes inhibidores pueden usarse para tratar enfermedades o afecciones inflamatorias tales como lesión por reperfusión, lesión por isquemia, apoplejía, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, artritis reumatoide, enfermedad celíaca, inmunodeficiencia hiper-IgM, arteriosclerosis, enfermedad de las arterias coronarias, sepsis, miocarditis, encefalitis, rechazo a los trasplantes, hepatitis, tiroiditis (por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves), osteoporosis, polimiositis, dermatomiositis, diabetes tipo I, gota, dermatitis, alopecia areata, lupus sistémico eritematoso, liquen escleroso, colitis ulcerosa, retinopatía diabética, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad periodontal, artritis, artritis juvenil crónica (por ejemplo, iridociclitis crónica), psoriasis, osteoporosis, nefropatía en diabetes mellitus, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad inflamatoria crónica del hígado, enfermedad inflamatoria crónica del pulmón, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria crónica del hígado, enfermedad inflamatoria crónica del pulmón, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, quemaduras (o lesiones térmicas), y otras enfermedades inflamatorias agudas y crónicas del sistema nervioso central (SNC; por ejemplo, esclerosis múltiple), el sistema gastrointestinal, la piel y estructuras asociadas, el sistema inmune, el sistema hepato-biliar o cualquier sitio del cuerpo en el que pueda ocurrir una patología con un componente inflamatorio.

5 Puede producirse una afección inflamatoria tal como una lesión por reperfusión o isquemia tras un episodio que ocurre de manera natural, por ejemplo una apoplejía o un infarto de miocardio. La lesión por reperfusión o isquemia también puede ocurrir durante y/o tras una intervención quirúrgica. Intervenciones quirúrgicas ejemplo que pueden provocar lesiones incluyen una técnica correctora de los vasos sanguíneos seleccionada del grupo que consiste en angioplastia, intervención para colocar un stent, aterectomía y cirugía de derivación (“bypass”). En una realización ejemplo, la lesión por reperfusión o isquemia ocurre en un tejido cardiovascular, tal como el corazón.

10 Además, las enfermedades o afecciones inflamatorias que son desencadenadas por unión de anticuerpos IgM naturales pueden tratarse o prevenirse en un sujeto eliminando del sujeto o inactivando una IgM natural o patógena y/o las células B que producen la inmunoglobulina patógena (por ejemplo, las células B-1 que se describen en la presente memoria), reduciendo de este modo la cantidad de la inmunoglobulina patógena y/o de células B presentes en el sujeto.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender eliminar del sujeto o inactivar una inmunoglobulina patógena, por ejemplo una IgM patógena que se describe en la presente memoria y/o células B que producen la IgM patógena (por ejemplo, las células B-1 que se describen en la presente memoria), reduciendo de este modo la cantidad de la inmunoglobulina patógena y/o de células B presentes en el sujeto.

15 En una realización, la etapa de eliminación o inactivación se realiza *ex vivo*. Las inmunoglobulinas patógenas y/o las células B pueden eliminarse por hemoperfusión. Alternativamente, las células B pueden eliminarse usando un anticuerpo específico de células B (por ejemplo, un anticuerpo anti-B-1 o un anticuerpo anti-CD5 o anti-CD11 G/CD 18). La inmunoglobulina patógena, por ejemplo una IgM, puede eliminarse poniendo en contacto sangre de un sujeto con un antígeno inmovilizado (por ejemplo, un antígeno específico de la isquemia) o un anticuerpo anti-idiotípico inmovilizado.
 20 La etapa de eliminación o inactivación de la inmunoglobulina patógena puede realizarse administrando al sujeto un anticuerpo anti-idiotípico. En otra realización, la etapa de eliminación o inactivación de las células B se realiza administrando al sujeto un resto (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo que se una al antígeno) que tenga como objetivo a las células B acoplado con una toxina, por ejemplo, la ricina o la toxina de la difteria. El sujeto es un mamífero, por ejemplo, un roedor (por ejemplo, un ratón) o un primate (por ejemplo, un ser humano). En una
 25 realización ejemplo, el sujeto ha mantenido una lesión isquémica o por reperfusión tras un episodio que ocurre de manera natural como, por ejemplo, una apoplejía, y la etapa de inactivación se lleva a cabo en unos minutos, una a cinco horas, cinco a diez horas, diez a veinte horas, uno a cinco días, después del episodio que ocurre de manera natural. En otra realización ejemplo, la lesión isquémica o por reperfusión se produce en un tejido cardiovascular, por ejemplo, el corazón, y la lesión isquémica o por reperfusión se previene y/o minimiza eliminando del sujeto la
 30 inmunoglobulina patógena, y/o las células B, antes de, durante y/o tras la intervención quirúrgica. Por ejemplo, la etapa de eliminación puede llevarse a cabo al menos una a cinco horas, cinco a diez horas, diez a veinte horas, o uno, dos o tres días antes de la intervención quirúrgica. La etapa de eliminación también puede continuarse durante intervalos de tiempo apropiados durante y después de la intervención quirúrgica.

6.7. Ensayos de diagnóstico

35 En la presente memoria se describe un método para detectar la presencia de un anticuerpo IgM natural en una muestra biológica. La detección de un anticuerpo IgM natural en un sujeto, particularmente en un mamífero, y especialmente en un ser humano, proporcionará un método de diagnóstico para el diagnóstico en un sujeto de una enfermedad o afección inflamatoria en el sujeto. En general, el método implica poner en contacto a la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar en la muestra al anticuerpo IgM natural de la invención o a un ácido nucleico de la invención.
 40 Cuando la expresión “muestra biológica” se usa con referencia a un ensayo de diagnóstico se pretende que incluya tejidos, células o fluidos biológicos aislados en el sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro del sujeto.

El método de detección puede usarse para detectar la presencia de un anticuerpo IgM natural o un ácido nucleico de la invención en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de un ácido nucleico de la invención incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la
 45 detección de polipéptidos de la invención incluyen ensayos con inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISAs), ensayos de inmunotransferencia, ensayos de inmunoprecipitación, de inmunofluorescencia, radioinmunoensayos y ensayos de unión competitiva.

Los ácidos nucleicos para diagnóstico pueden obtenerse a partir de células y tejidos de individuos infectados, tales como huesos, sangre, músculos, cartílagos y piel. Los ácidos nucleicos, por ejemplo el DNA y el RNA, pueden usarse
 50 directamente para la detección o pueden amplificarse, por ejemplo, enzimáticamente usando PCR u otra técnica de amplificación, antes del análisis. Usando la amplificación, la caracterización de las especies y la cepa de procarionta presentes en un individuo puede hacerse mediante un análisis del genotipo del gen procarionta. Pueden detectarse supresiones e inserciones mediante un cambio del tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo de una secuencia de referencia. Pueden identificarse mutaciones puntuales hibridando un ácido nucleico, por ejemplo DNA amplificado, con un ácido nucleico de la invención, ácido nucleico que puede estar marcado. Las secuencias que concuerdan perfectamente pueden distinguirse de dobles no coincidentes por digestión con RNasa o por diferencias en las temperaturas de fusión. Las diferencias entre las secuencias de DNA también pueden detectarse por alteraciones en la movilidad electroforética de los fragmentos de DNA en geles, con o sin agentes desnaturizantes, o por secuenciación directa de DNA. Véase, por ejemplo, Myers et al., Science, 230: 1242 (1985). También pueden revelarse

cambios en las secuencias en localizaciones específicas mediante ensayos de protección de nucleasas, tales como protección de RNasa y S1 o un método de escisión química. Véase, por ejemplo, Cotton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85: 4397-4401 (1985).

5 Los agentes para detectar un ácido nucleico de la invención, por ejemplo, que comprende la secuencia puesta de manifiesto en una secuencia de ácido nucleico objeto, incluyen sondas de ácidos nucleicos marcadas capaces de hibridarse con un ácido nucleico de la invención. La sonda de ácido nucleico puede comprender, por ejemplo, la secuencia de longitud completa de un ácido nucleico de la invención, o un equivalente de la misma, o una porción de la misma, tal como un oligonucleótido de al menos 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas a una secuencia de ácido nucleico objeto, o a su complemento.

10 Los agentes para detectar un polipéptido de la invención, por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos objeto, incluyen anticuerpos marcados capaces de unirse a un anticuerpo IgM natural de la invención. Los anticuerpos anti-idiotípicos pueden ser policlonales o, alternativamente, monoclonales. Puede usarse un anticuerpo anti-idiotípico intacto, o un fragmento del mismo. El marcaje de la sonda o del anticuerpo también engloba el marcaje directo de la sonda o del anticuerpo acoplado (por ejemplo, físicamente unido) una sustancia detectable a la sonda o al anticuerpo, así como por marcaje indirecto de la sonda o el anticuerpo por reacción con otro reactivo que está directamente marcado. Ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y el marcaje terminal de una sonda de DNA con biotina tal que pueda detectarse con estreptavidina marcada fluorescentemente.

20 La detección de un ácido nucleico de la invención en una muestra biológica puede implicar el uso de una sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n^os 4.683.195 y 4.683.202), tal como PCR o RASCE PCR de anclaje o PCR RACE, o, alternativamente, en una reacción en cadena por ligadura (LCR) (véase, por ejemplo, Landegran et al. (1988) *Science* 241: 1077-1080; y Nakazawa et al. (1994) *PNAS* 91: 360-364), la última de las cuales puede ser particularmente útil para distinguir entre ortólogos de polinucleótidos de la invención (véase Abravaya et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23: 675-682). Este método puede incluir las etapas de recoger una muestra de células de un paciente, aislar el ácido nucleico (por ejemplo, genómico, mRNA, o ambos) de las células de la muestra, poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que se hibridan específicamente con un ácido nucleico de la invención en condiciones tales que se produzca la hibridación y la amplificación del polinucleótido (si está presente), y detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, o detectar el tamaño del producto de amplificación y comparar la longitud con una muestra testigo.

30 Un método para detectar la presencia de un anticuerpo IgM natural en una muestra puede comprender: (a) proporcionar una muestra a ensayar respecto a la presencia de un anticuerpo IgM natural; (b) poner en contacto la muestra con un reactivo tipo anticuerpo anti-idiotípico frente a aproximadamente ocho residuos de aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos objeto de tal especie en condiciones que permitan la asociación entre el anticuerpo anti-idiotípico y su ligando; y (c) detectar la interacción del anticuerpo anti-idiotípico con su ligando, mediante lo cual se detecta la presencia de un anticuerpo IgM natural en la muestra.

35 Otro método para detectar la presencia de un anticuerpo IgM natural en una muestra puede comprender: (a) proporcionar una muestra a ensayar respecto a la presencia de un anticuerpo IgM natural; (b) poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-idiotípico que se une específicamente a un polipéptido de la invención de tal especie en condiciones que permitan la asociación entre el anticuerpo anti-idiotípico y su ligando, y (c) detectar la interacción del anticuerpo anti-idiotípico con su ligando, mediante lo cual se detecta la presencia de tal especie en la muestra.

40 Un método para diagnosticar que un paciente padece una enfermedad o afección inflamatoria relacionada con la presencia de un anticuerpo IgM natural puede comprender: (a) obtener una muestra biológica del paciente; (b) detectar en la muestra la presencia o ausencia de un polipéptido de la invención, por ejemplo un anticuerpo IgM natural, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención; y (c) diagnosticar que un paciente padece de tal enfermedad o afección inflamatoria basándose en la presencia en la muestra del paciente de un polipéptido de la invención o de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención.

45 Tales ensayos de diagnóstico también pueden usarse para monitorizar la efectividad de un tratamiento en un individuo que padece una enfermedad o afección inflamatoria relacionada con un anticuerpo IgM natural. Por ejemplo, la presencia y/o una cantidad de un ácido nucleico de la invención o de un polipéptido de la invención puede detectarse en un individuo que padece una enfermedad o afección inflamatoria relacionada con un anticuerpo IgM natural antes y después del tratamiento con un agente terapéutico del anticuerpo IgM natural. Cualquier cambio en la concentración de un polinucleótido o polipéptido de la invención después del tratamiento del individuo con el agente terapéutico proporciona información acerca de la efectividad del curso del tratamiento. En particular, ningún cambio, o una disminución, en la concentración de un polinucleótido o polipéptido de la invención presente en la muestra biológica indicarán que el agente terapéutico está combatiendo exitosamente tal enfermedad o trastorno.

55 Alternativamente, los polipéptidos de la invención, por ejemplo, anticuerpos IgM naturales, puede detectarse in vivo en un sujeto introduciendo en el sujeto un anticuerpo marcado específico para un polipéptido de la invención, por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotípico para detectar anticuerpos IgM naturales. Por ejemplo, el anticuerpo anti-idiotípico puede

marcarse con un marcador radionucleido cuya presencia y localización en un sujeto puede detectarse por técnicas de imágenes estándar.

5 Un "radionucleido" se refiere a una molécula que es capaz de generar una imagen detectable que puede detectarse visualmente o usando un instrumento apropiado, por ejemplo tomografía de emisión de positrones (PET) y tomografía de emisión de fotones (SPECT). Los radionucleidos útiles dentro de la presente descripción incluyen emisores de fotones penetrantes que incluyen emisores de rayos gamma y rayos X. Estos rayos acompañan a transformaciones nucleares tales como la captura de electrones, la emisión beta y la transición isomérica. Los radionucleidos útiles incluyen aquellos con fotones entre 80 y 400 keV y productores de positrones, fotones de aniquilación de 511 keV y dosis aceptables de radiación debidas a fotones absorbidos, partículas y semivida. Los radionucleidos incluyen isótopos radioactivos de un elemento. Ejemplos de radionucleidos incluyen ^{123}I , ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{18\text{F}}$, ^{68}Ga , ^{62}Cu , ^{111}In , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{90}Y , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{89}Sr , ^{166}Ho , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{100}Pd , ^{212}Pb , ^{109}Pd , ^{67}Ga , ^{94}Tc , ^{105}Rh , ^{95}Ru , ^{177}Lu , ^{170}Lu , ^{11}C y ^{76}Br .

10 En una realización, puede marcarse un anticuerpo anti-idiotípico que reconoce a un anticuerpo IgM natural de la presente invención con $^{99\text{m}}\text{Tc}$. $^{99\text{m}}\text{Tc}$, un radionucleido normalmente usado en medicina nuclear, combina unas propiedades físicas deseables con una semivida de 6 h y una energía gamma de 140 keV (85% como fotones gamma) y una amplia disponibilidad ya que puede eluirse fácilmente de generadores de molibdeno.

15 Los agentes de generación de imágenes de la descripción pueden usarse de la siguiente manera. Puede combinarse una cantidad efectiva del agente de generación de imágenes (de 1 a 50 mCi) con un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en los estudios de generación de imágenes. Según la descripción, "una cantidad efectiva" del agente de generación de imágenes de la descripción se define como una cantidad suficiente para dar una imagen aceptable usando equipamiento que está disponible para uso clínico. Una cantidad efectiva del agente de generación de imágenes de la descripción puede administrarse en más de una inyección. Las cantidades efectivas del agente de generación de imágenes de la descripción también variarán según el instrumento y factores relacionados con la película. La optimización de tales factores está dentro del nivel de competencia de una persona experta en la técnica.

20 La cantidad de agente de generación de imágenes usada con fines de diagnóstico y la duración del estudio de imágenes dependerá de la naturaleza y de la gravedad de la afección a tratar, de la naturaleza de los tratamientos terapéuticos que tienen que recibir los pacientes y de las respuestas idiosincrásicas del paciente. En última instancia, el médico decidirá la cantidad de agente de generación de imágenes a administrar a cada paciente individual y la duración del estudio de imágenes.

25 El vehículo farmacéuticamente aceptable para un agente de generación de imágenes de la descripción puede incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retardan la absorción, y semejantes. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. El agente de generación de imágenes de la descripción puede además administrarse a un individuo en un diluyente o compuesto auxiliar apropiado, coadministrarse con agentes inhibidores de enzimas o en un vehículo apropiado tal como albúmina de suero humano o liposomas. También pueden incorporarse en el agente de generación de imágenes de la descripción compuestos activos suplementarios. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen disolución salina y disoluciones acuosas amortiguadoras del pH. Los compuestos auxiliares contemplados en la presente memoria incluyen resorcinoles, tensioactivos no iónicos tales como polioxietileno oleil éter y n-hexadecil polietileno éter. Los agentes inhibidores de enzimas incluyen agentes inhibidores de la tripsina pancreática, pirocarbonato de dietilo y trasilol. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF agua en aceite en agua así como liposomas convencionales (Strejan et al. (1984) *J. Neuroimmunol.* 7, 27).

30 En una realización, el agente de generación de imágenes de la descripción se administra parenteralmente como inyecciones (intravenosa, intramuscular o subcutánea). El agente de generación de imágenes puede formularse como una disolución acuosa parenteralmente aceptable estéril y exenta de pirógenos. La preparación de tales disoluciones parenteralmente aceptables en lo que se refiere al pH, isotonicidad, estabilidad y semejantes, está dentro de lo conocido en la técnica. Ciertas composiciones farmacéuticas de esta descripción adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más agentes de generación de imágenes en combinación con uno o más polvos estériles farmacéuticamente aceptables que pueden reconstituirse en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, las cuales pueden contener antioxidantes, agentes amortiguadores del PH, agentes bacteriostáticos, solutos que hacen que la disolución sea isotónica con la sangre del pretendido receptor o agentes de suspensión o de espesamiento. Una formulación para inyectar debe contener, además del agente de generación de imágenes cardiovasculares, un vehículo isotónico tal como una disolución de cloruro de sodio, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, disolución de dextrosa y de cloruro de sodio, disolución de Ringer con lactato, disolución de dextrano, disolución de sorbitol, una disolución que contiene poli(alcohol vinílico), o una disolución osmóticamente equilibrada que comprende un tensioactivo y un agente reforzante de la viscosidad, u otro vehículo que se conozca en la técnica. La formulación usada en la presente descripción también puede contener agentes estabilizantes, agentes conservantes, agentes amortiguadores del pH, antioxidantes u otros aditivos conocidos por los expertos en la técnica.

35 En la presente memoria también se describen kits para detectar la presencia de un anticuerpo IgM natural en una muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto marcado o un agente capaz de detectar un polinucleótido o un polipéptido de la invención en una muestra biológica; medios para determinar la cantidad de un

anticuerpo IgM natural en la muestra; y medios para comparar la cantidad de un anticuerpo IgM natural en la muestra con un patrón. También puede proporcionarse un compuesto no marcado con instrucciones para marcar el compuesto. El compuesto o agente puede envasarse en un recipiente adecuado. El kit puede además comprender instrucciones para usar el kit para detectar un polinucleótido o un polipéptido de la invención.

5 **Ejemplos**

La invención, que ha sido descrita en general, puede entenderse más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se incluyen meramente con fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no se pretende que limiten la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1: mecanismos de lesión por isquemia-reperfusión

10 Este ejemplo muestra que los ratones deficientes en el sistema del complemento fueron resistentes a la lesión por isquemia-reperfusión.

15 Para examinar el mecanismo de la lesión por isquemia-reperfusión se trataron ratones deficientes en el complemento C3 en el modelo de los miembros posteriores. Se protegió parcialmente a los ratones C3^{-/-} de lesiones basándose en una reducción aproximada del 50% del índice de permeabilidad (véase Weiser et al. (1996) *J. Exp. Med.* 1857-1864). Así, el complemento C3 es esencial para inducir una lesión completa en este modelo murino.

20 Los experimentos descritos por Weiser et al. no identificaron cómo era activado el complemento. El sistema del complemento del suero puede activarse mediante al menos tres rutas distintas, la clásica, la de las lectinas o una alternativa. Saber qué ruta está implicada es importante ya que sugiere un mecanismo para la lesión. Por ejemplo, la ruta clásica es activada muy eficientemente por isotipos IgM e IgG de inmunoglobulina o por la proteína C-reactiva de reconocimiento del suero. Mientras que la ruta de las lectinas es activada tras el reconocimiento de carbohidratos específicos, tales como manano, por la lectina que se une al manano (MBL) (Epstein et al., (1996) *Immunol* 8, 29-35). En ambas rutas se requiere el complemento C4 para formar un complejo enzimático con C2 que cataliza la escisión del componente C3 central. En contraste, la ruta alternativa se activa espontáneamente conduciendo a la conversión de C3 en su forma activa (C3b) y a la unión a los tejidos extraños o propios. La ruta está estrechamente regulada ya que todas las células huésped expresan agentes inhibidores de la amplificación de la ruta del complemento inactivando, o desplazando, la C3 convertasa (Muller-Eberhard, H.J., (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57, 321-347). Un enfoque para determinar la ruta implicada es el uso de ratones deficientes en C4, es decir que no pueden formar la C3 convertasa vía las rutas clásica o de la lectina. La comparación de ratones deficientes en C3 ó C4 con testigos tipo silvestre (WT) en el modelo de los miembros posteriores reveló que también se requería C4 para inducir una lesión completa (Weiser et al., *supra*). Este hallazgo fue importante ya que sugirió que podrían estar implicados un anticuerpo o MBL.

Ejemplo 2: IgM natural media la lesión por isquemia-reperfusión (I/R)

Este ejemplo muestra que los ratones deficientes en inmunoglobulina fueron resistentes a la lesión por isquemia-reperfusión.

35 Para determinar si un anticuerpo estaba implicado en la mediación de la lesión I/R se caracterizaron ratones totalmente deficientes en inmunoglobulina, RAG2^{-/-} (deficiente en el gen-2 que activa a la recombinasa) junto con animales deficientes en el complemento en el modelo intestinal. Significativamente, los ratones RAG2^{-/-} fueron protegidos en una extensión similar a la observado en animales deficientes en el complemento (Weiser et al., *supra*). Puesto que los animales RAG2^{-/-} también estaban perdiendo linfocitos maduros, fue importante determinar que el efecto patógeno dependía del anticuerpo (Shinkai et al. (1992) *Cell* 68, 855-867). Para confirmar que la lesión estaba mediada por el anticuerpo del suero, a los animales deficientes se les reconstituyó con suero normal o de ratón (Weiser et al., *supra*) o con IgM purificada (Williams et al. (1999) *J. Appl. Physiol.* 86; 938-42). En ambos casos, los ratones RAG2^{-/-} no estuvieron ya protegidos y la lesión se restauró. En los últimos experimentos se usó un modelo de lesión intestinal ya que en este modelo se piensa que la lesión está mediada principalmente por el complemento.

45 La interpretación de estos resultados es que durante el período de isquemia en la superficie de la célula endotelial están expuestos o se expresan neoantígenos. Las IgMs circulantes parecen reconocer al nuevo determinante, se unen y activan la ruta clásica del complemento. Aunque no se conoce la naturaleza del antígeno, parece ser que IgM en lugar de IgG es principalmente responsable de la activación del complemento ya que la reconstitución de ratones deficientes con IgG no restauró significativamente la lesión en ratones. Una hipótesis alternativa es que hay otro suceso inicial tal como la ruta MBL que reconoce la superficie endotelial alterada, induce un nivel bajo de activación del complemento, lo cual a su vez expone nuevos sitios antigénicos y la ruta se amplifica mediante la unión de IgM.

Ejemplo 3: la IgM patógena es un producto de las células B-1

55 Puesto que se piensa que una fracción grande de IgM circulante representa a un anticuerpo natural, es decir producto de genes reagrupados de líneas germinales, es posible que los ratones que porten deficiencias en la fracción B-1 de linfocitos también pudieran estar protegidos. Las células B-1 tienen un fenotipo distinto de las células B-2 más convencionales porque expresan bajas concentraciones de IgD y CD23 y una gran fracción expresa la proteína CD5 de la superficie celular (Hardy et al., (1994) *Immunol. Rev.*: 137, 91; Cantor et al. (1993) *Annu. Rev. Immunol.* 11, 501-538,

1993. Las células B-1 también se distinguen por una circulación reducida en ratones, una frecuencia limitada en los nódulos linfáticos periféricos y el bazo y están principalmente localizadas dentro de la cavidad peritoneal. Para examinar el papel de las células B-1 como fuente de IgM patógena, se reconstituyeron ratones deficientes en anticuerpos (RAG-2-/-) con 5×10^5 células B-1 peritoneales y se dejaron descansar aproximadamente 30 días antes del tratamiento. Las concentraciones de IgM circulante alcanzan un intervalo cercano al normal antes de un mes después de la transferencia adoptiva. La caracterización de los ratones reconstituidos con células B-1 en el modelo de isquemia intestinal confirmó que las células B-1 eran una fuente principal de IgM patógena (véase Williams et al. (1999) *supra*). Esta fue una importante observación porque el repertorio de anticuerpos naturales de células B-1 es considerablemente más limitado de lo que se esperaría para células B-2 convencionales. Por lo tanto, es posible que el anticuerpo patógeno represente un producto de línea germinal.

Ejemplo 4: los ratones Cr2^{-/-} están protegidos contra la lesión por isquemia-reperfusión

La caracterización inicial de ratones sin Cr2^{-/-} reveló una reducción aproximada del 50% en la frecuencia de células B-1a o CD5⁺ B1 (Aheam et al. (1996) *Immunity* 4: 251-262). Aunque la caracterización de otra cepa de ratones deficientes en Cr2 no identificó una reducción similar (Molina et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3357-3361). No se sabe si la diferencia de la frecuencia de células CD5⁺ fue debida a una variación del historial de la cepa o a diferencias medioambientales. A pesar de la frecuencia reducida de células B-1 en ratones Cr2^{-/-}, las concentraciones de IgM circulante estuvieron dentro del intervalo normal. Estos hallazgos sugirieron que el repertorio de IgM podría ser diferente en los animales deficientes en Cr2. Para ensayar esta hipótesis, se caracterizaron ratones en el modelo I/R intestinal. Sorprendentemente, los ratones Cr2^{-/-} estuvieron igualmente protegidos que los ratones deficientes en anticuerpos completos (figura 3). La comparación de la supervivencia en un período de 5 días tras el tratamiento en el modelo intestinal demostró un aumento significativo en la mortalidad de los ratones WT en comparación con los animales deficientes en Cr2. En consistencia con una mortalidad acrecentada se observó una reducción drástica en secciones de tejidos cosechadas de ratones deficientes en Cr2^{-/-} o WT tratados.

Se observó una lesión amplia en la capa mucosal del intestino en ratones WT o en ratones Cr2^{-/-} reconstituidos con IgM agrupada o células B-1. En contraste, las secciones de tejidos aisladas de ratones Cr2^{-/-} tratados fueron similares a la de los falsos testigos. Así, a pesar de las concentraciones circulantes normales de IgM, los ratones deficientes en Cr2^{-/-} estuvieron protegidos de la lesión. Estos resultados no sólo confirman la importancia de las células B-1 como fuente de anticuerpos patógenos sino que sugieren que el sistema del complemento está de algún modo implicado en la formación o el mantenimiento del repertorio de anticuerpos naturales. Por ejemplo, el complemento puede estar implicado en la selección positiva de células B-1.

Ejemplo 5: identificación de IgMs patógenas

Este ejemplo describe la generación de un clon específico de hibridoma de células B-1 normales y la identificación de un clon que produce una IgM patógena. Se demostró que la IgM patógena restauraba la lesión *in vivo* en ratones deficientes en el anticuerpo.

Estudios en ratones que portaban una deficiencia en los receptores CD21/CD35 del complemento revelaron que los ratones habían perdido el anticuerpo patógeno. Este hallazgo fue inesperado porque tenían una concentración normal de IgM en la sangre. Estos hallazgos condujeron a la hipótesis de que una población especial de células B denominada células B-1 son las responsables de la secreción de la IgM patógena. Por ejemplo, el injerto en ratones deficientes en los receptores (Cr2^{-/-}) de células B-1 de ratones normales restauró la lesión, confirmando la importancia de las células B-1. Para identificar el anticuerpo o anticuerpos específicos responsables de la lesión, se construyó un panel de clones de hibridoma a partir de un conjunto enriquecido de células B-1 peritoneales cosechadas de ratones normales. El enfoque general para preparar hibridomas a partir de la fracción enriquecida de células peritoneales incluye cosechar células peritoneales de ratones tratados 7 días antes con IL-10 y subsiguientemente enriquecidas respecto a células B CD23 negativas mediante selección negativa con bolas magnéticas. Las células B enriquecidas se analizan mediante FACS tras tinción con IgM, Mac-1 y Mab CD23 específicos. La población enriquecida se activa adicionalmente cultivando con LPS durante 24 horas. Las células activadas se hibridan con células de mieloma socios de fusión en presencia de PEG y se hacen crecer en medio HAT-selectivo. Los hibridomas se exploran buscando clones que secreten IgM mediante ensayo ELISA, y las células positivas se expanden para la purificación de IgM.

Se analizaron veintidós clones de hibridoma que secretaban IgM mezclando una cantidad igual de IgM producto de cada uno de los clones. El tratamiento de ratones deficientes en anticuerpos con la IgM mezclada restauró una lesión similar a la vista con IgM mezclada de suero. Este hallazgo confirmó que la IgM patógena estaba entre los veintidós hibridomas producidos. Dividiendo las mezclas en dos fracciones, es decir, 1-11 y 12-22, y tratando los ratones con las dos fracciones, se encontró que el anticuerpo patógeno se fraccionó con la mezcla que incluía el clon nº 22. Finalmente, los ratones fueron reconstituidos con el clon 17 ó 22. El clon 22 restauró la lesión mientras que los otros clones no lo hicieron (véase la figura 4).

Ejemplo 6: implicación del complemento en la selección de células B-1

Para explicar el desarrollo de células B-1 se han propuesto dos modelos diferentes. La hipótesis del linaje propone que las células B-1 se desarrollan en la vida fetal inicial como una población distinta (Kantor et al. (1993) *supra*).

Alternativamente, las células B-1 se desarrollan a partir de los mismos progenitores que las células B convencionales pero dependiendo de su medio ambiente, es decir, se encuentran con el antígeno, se desarrollan en B-1 o retienen el fenotipo de células B-2 (Wortis, H.H. (1992) *Int. Rev. Immunol.* 8, 235; Clarke, J. (1998) *Exp. Med.* 187, 1325-1334). Independientemente de su origen, se sabe que las células B-1 no son repuestas desde la médula ósea de adultos con la misma frecuencia que las células B-2 y que su fenotipo es más similar al de las células B de hígado fetal precoz o al de células neonatales de médula ósea (BM). En consistencia con un origen precoz, su repertorio tiende a inclinarse hacia la expresión de más genes V_H proximales y la adición N-nucleótido está limitada (Gu et al. (1990) *EMBO J* 9, 2133; Feeney, J. (1990) *Exp. Med.* 172, 1377). Parece razonable que dada la reducida reposición mediante células madre de BM de adulto, las células B-1 se auto-renuevan y que la estimulación por antígenos podría ser importante en su renovación, expansión o incluso selección inicial (Hayakawa et al., (1986) *Eur. J. Immunol.* 16, 1313). De hecho, que las células B-1 tengan que ser seleccionadas por antígenos es intrínseco al modelo convencional.

Una evidencia que soporta la existencia de un requisito de transmisión de señales de los receptores de células B (BCR) para una selección positiva de células B-1 viene de ratones que portan mutaciones que alteran la transmisión de señales de los BCR. Por ejemplo, el deterioro de la transmisión de señales de los BCR por medio de CD19, *vav* o *Btk* afecta drásticamente al desarrollo de las células B-1. En contraste, la pérdida de selección negativa tal como en ratones deficientes en CD22- o SHIP-1 puede conducir a un aumento en la frecuencia de células B-1 (O'Keefe et al. (1996) *Science* 274, 798-801; Shultz et al. (1993) *Cell* 73, 1445). Recientemente, elegantes estudios con ratones que portan dos transgenes Ig distintos, V_H12 (fenotipo de células B-1) o V_HB1-8 (fenotipo de células B-2) soportan la visión de que las células B-1 son positivamente seleccionadas por auto-antígenos. Por ejemplo, las células B que expresan V_H12 solo o junto con B1-8 desarrollaron un fenotipo de células B-1, mientras que se identificaron pocas, si algunas, células B que expresaran sólo el transgén B1-8. Por tanto, estos resultados sugieren que el encuentro de células B transgénicas con auto-PtC dio lugar a una expansión de las que expresan V_H12 . Recientemente, Hardy et al. ((1994) *Immunol. Rev.* 137, 91). En su modelo, las células B que expresaban un transgén de inmunoglobulina específico de Thy 1.1 se seleccionaron y expandieron en ratones que expresaban al antígeno afín. En contraste, el transgén + las células B-1 no fueron encontrados en ratones que expresaban el alotipo alternativo Thy 1.2.

¿Cuando encaja el complemento en el desarrollo de células B-1? La reducción global en la frecuencia de células B-1a y la pérdida más específica de células B-1 que expresan IgM implicada en la lesión I/R sugiere un papel para CD21/CD35 en la selección positiva o en el mantenimiento de células B-1a. Un posible papel del complemento es que refuerza la transmisión de señales de los BCR para el encuentro con el antígeno afín. Estudios bioquímicos y el análisis de ratones deficientes en CD21/CD35 demuestran la importancia de la transmisión de señales del co-receptor en la activación y supervivencia de las células B convencionales (Carroll, M.C., (1998) *Annu. Rev. Immunol.* 16, 545-568; Fearon et al. (1995) *Annu. Rev. Immunol.* 13, 127-149). Es muy probable que las células B-1 utilicen asimismo la transmisión de señales del co-receptor para reforzar la transmisión de señales del BCR. Por ejemplo, las bacterias expresan antígenos típicos de células B-1 tales como fosforil-colina y no es irrazonable pensar que revestir bacterias con el ligando C3d del complemento reforzaría la reticulación del co-receptor con el BCR y reforzaría la transmisión global de señales. Por tanto, los antígenos expresados en bajas concentraciones podrían requerir el refuerzo del complemento con el fin de que los reconocieran las células B afines y se expandieran o seleccionaran positivamente. Otro papel de los receptores del complemento está en localizar al antígeno sobre células dendríticas foliculares (FDC) dentro del compartimento linfático. Sin embargo, puesto que la población principal de células B-1 ocupa los tejidos peritoneales no está claro si encontrarían FDC dentro de las estructuras linfáticas. No se conoce el sitio o los sitios reales en los que las células B-1 experimentan selección positiva. Es posible que tengan que encontrar al antígeno afín en el desarrollo fetal temprano o en BM neonatal. Si este es el caso, podría esperarse que los receptores del complemento en células estromales sitas dentro de estos compartimentos se unan al antígeno para presentarse a las células B. es posible que los receptores del complemento pudieran participar en ambas etapas de desarrollo. En primer lugar, podrían reforzar a los antígenos que transmiten la señal en la selección positiva. En segundo lugar, cuando las células B-1 seleccionadas sean repuestas en los sitios periféricos, los receptores del complemento podrían otra vez estar implicados en el reforzamiento de la transmisión de señales de los BCR.

La figura 5 es un diagrama esquemático del papel propuesto para el complemento y los receptores del complemento en la selección positiva de linfocitos B-1 peritoneales. La interacción de complemento-antígenos revestidos de ligando (auto y no auto) da lugar a la coligadura del co-receptor CD21/CD19 y del BCR sobre la superficie celular lo que conduce a la transmisión reforzada de la señal y a la selección positiva.

Ejemplo 7: materiales y métodos para los ejemplos 8-11

Biblioteca de péptidos de expresión en fagos y síntesis de péptidos

Se exploró una biblioteca 12-mer de expresión en el fago M-13 (New England Biolab, MA) mediante 4 rondas con bolas MBL revestidas con IgM^{CM-22} y 2 rondas con IgM^{CM-75} según las recomendaciones del fabricante. Los clones de fagos se seleccionaron del conjunto enriquecido y la secuencia de nucleótidos del gen relevante del fago se determinó para al menos diez clones. Los péptidos seleccionados fueron sintetizados con una pureza > 95% en Harvard Proteomic Core o en New England Peptide, Inc. (Gardner, MA).

Ensayos de unión

Se realizaron ensayos ELISA como se describió antes (Zhang et al. (2004) *PNAS USA* 101: 3886-91). Brevemente, la unión de IgM a péptidos de fagos o específicos de fagos se determinó revistiendo una placa de 96 pocillos con cantidades saturantes de antígeno. Tras el bloqueo se añadió IgM (1 ó 10 $\mu\text{g/mL}$) durante 2 h a 37°C. Las placas se lavaron y a continuación se desarrollaron con IgM de cabra anti-ratón marcada con fosfatasa alcalina (Sigma, MO). La unión de IgM a NMHC-II se determinó cultivando placas de 96 pocillos previamente revestidas con anticuerpo específico de conejo (NMHC-II A & B; Covance Research Products; NMHC-II C un regalo del Dr. Adelstein, NHLBI, NIH, Bethesda, MD) o Hc de pan-miosina (Sigma, MO) con lisados intestinales preparados a partir de ratones RAG-1^{-/-} reconstituidos con IgM^{CM-22} tratados falsamente o tratados contra la isquemia como se ha descrito (Zhang et al. (2004) *PNAS USA* 101: 3886-91). Los lisados se prepararon como se describe para la inmunoprecipitación (véase más adelante). A continuación, se usó IgM de cabra anti-ratón marcada con fosfatasa alcalina (Sigma, MO) para detectar la IgM unida.

Modelo intestinal de RI

El protocolo quirúrgico para RI se realizó como se describió previamente (Zhang et al. (2004) *PNAS USA* 101: 3886-91). Brevemente, se realizó una laparotomía y se aplicó un micro-clip (presión 125 g, Roboz, MD) a la arteria mesentérica superior y se limitó la circulación bilateral con suturas de seda que flanqueaban un segmento de 20 cm del yeyuno. Después de 40 minutos de isquemia se separó el micro-clip y se confirmó la reperusión de la vasculatura mesentérica mediante el retorno de la pulsación a la arcada vascular y un cambio a color rosa. La incisión se cerró y todos los animales se mantuvieron calientes durante 3 horas. 30 min antes de la laparotomía inicial los animales RAG-1^{-/-} recibieron intravenosamente IgM mezclada con péptido o disolución salina en un volumen de 0,2 mL. Los animales WT se trataron con disolución salina o péptido i.v. 5 min antes de la reperusión. Al final de la reperusión, el segmento isquémico del yeyuno se cosechó y se cortaron 4 cm centrales para su análisis patológico.

Análisis histopatológico e inmuno-histoquímico

Se tiñeron secciones criostáticas de tejidos intestinales mediante hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron por microscopía de luz respecto al daño de la mucosa. La puntuación patológica se evaluó basándose en un procedimiento de Chiu (Chiu et al., *Arch Surg* 101: 484-488, 1970; Chiu et al., *Arch Surg* 101: 478-483, 1970) que incluía la inspección directa de todas las microvelosidades en una tira de 4 cm de yeyuno como se ha descrito (Zhang et al. (2004) *PNAS USA* 101: 3886-91). Para el ensayo de inmunofluorescencia, se incubaron durante períodos variables criosecciones fijadas con paraformaldehído al 4% (p/v) con IgM anti-ratón marcada con biotina (Becton Dickinson, CA) seguido por 1 hora con estreptavidina-Alexa-568 (dilución 1:500, Molecular Probes, OR). La deposición de C4 se detectó tiñendo con anti-huC4c de conejo marcada con FITC (DAKO, CO), seguida por anti-conejo-Alexa 488 (Molecular Probes, OR). La especificidad de la tinción de anti-C4c se confirmó tiñendo secciones en serie con C4 anti-ratón marcada con biotina durante 1 hora seguido por estreptavidina-FITC (Becton Dickinson, CA). La deposición de C3 se detectó tratando anti-C3 marcado con FITC (DAKO, CO). Se montaron secciones en medio de montaje anti-decolorante con DAPI (Molecular Probes, OR).

Análisis SPR de la unión del péptido al anticuerpo

Se inmovilizó un anticuerpo IgM (IgM^{CM-22} o IgM^{CM-31}) por condensación con un grupo amina en una celda de flujo del chip BiaCore SPR CM5TM a una densidad de 33.400 unidades de respuesta (RU) ~ 33 ng/mm² como se ha descrito (Vorup-Jensen et al., *PNAS USA* 100: 1873-1878, 2003). Brevemente, se prepara una celda de flujo de referencia por condensación de etanolamina-HCl. Los péptidos, diluidos en una disolución de elución amortiguadora del pH de PBS, se hicieron fluir separadamente sobre la superficie condensada con IgM y la referencia, a un caudal de 10 $\mu\text{L/min}$ a 25°C y con una velocidad de recogida de datos a 10 Hz. La fase de inyección tuvo una duración de 240 s (los finales de las fases de inyección están marcados por puntas de flecha en las figuras 9A, B y D). Las isotermas de unión se derivaron sustrayendo la respuesta en la celda de referencia de la respuesta de la superficie condensada con IgM. Tras cada ensayo, la superficie se regeneró inyectando 40 μL de monolaurato de polioxi-etilensorbitán al 0,05% (v/v)/PBS.

Inmunoprecipitación

Se homogeneizaron tejidos congelados en una disolución amortiguadora del pH de lisis que contenía un detergente y un cóctel de agentes inhibidores enzimáticos. Se analizó una muestra de lisado respecto al contenido total de proteínas (kit BioRad) para asegurar concentraciones similares de proteínas para analizar. Los lisados se mezclaron con bolas de sefarosa revestidas con IgM anti-ratón de rata durante 1 h a 4°C. Subsiguientemente, las bolas se pelletizaron suavemente, se lavaron en disolución amortiguadora del pH de lisis y luego se hirvieron en disolución amortiguadora del pH muestra-SDS en condiciones reductoras para eluir los complejos enlazados. Las muestras se fraccionaron en geles SDS de poliacrilamida al 6% (p/v) y subsiguientemente se fijaron y luego se tiñeron con azul de coomassie o tinte de plata para identificar las bandas de proteínas.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas en tándem

Se cortaron bandas individuales teñidas con azul de coomassie de los geles SDS, se destiñeron y se sometieron a digestión enzimática como se describió previamente (Borodovsky et al., *Chem Biol* 9: 1149-1159, 2002). Los péptidos se separaron usando un sistema acoplado de cromatografía de líquidos con nanoflujo (Waters Cap LC) y las secuencias de aminoácidos se determinaron por espectrometría de masas en tándem (Q-TOF micro, Waters, MA). Los datos MS/MS se procesaron y se sometieron a búsquedas en bases de datos usando la base de datos Mascot (matrixscience) frente a la base de datos Swissprot, TREMBL/New o la base de datos no redundante NCBY.

Ejemplo 8: identificación de péptidos ricos en asparagina que se unen al anticuerpo IgM natural

Los presentes inventores han identificado previamente un clon de hibridoma de un anticuerpo IgM natural (IgM^{CM-22}) que se une a tejido isquémico en el modelo de RI intestinal, lo cual soporta la hipótesis de dichos inventores de que el tejido isquémico era alterado en relación al tejido normal y que los neo-epítopes expresados durante la isquemia eran dianas para una respuesta innata a la misma. Para caracterizar el ligando enlazado por IgM^{CM-22} patógena se exploró una biblioteca de expresión en el fago M13 de 12-mer secuencias de aminoácidos usando bolas revestidas con la IgM específica.

Después de cuatro rondas de exploración específica y dos rondas con una IgM testigo (clon IgM^{CM-75}), se aislaron 10 clones de fago y se secuenció la secuencia de nucleótidos del gen relevante de M-13. Notablemente, todos los diez clones contuvieron secuencias ricas en asparagina. Cinco de los clones se seleccionaron para un ensayo de unión relativa con IgM^{CM-22} y uno de estos clones, P8, que se unió con la mayor eficiencia, se seleccionó para un estudio posterior (Tabla 4 y figura 6A).

Tabla 4: péptidos expresados en fago se unen a IgM^{CM-22}

Clon del fago	Secuencia	SEQ ID NO:
P1	YNNNNGNYTYRN	16
P2	ANTRNGATNNNM	18
P3	CDSSCDSVGN CN	20
P4	WNNNGRNACNAN	22
P5	HNSTSNGCNDNV	24
P6	NSNSRYNSNSNN	26
P7	KRNNHNNHNRSN	28
P8	NGNNVNGNRNNN	30
P9	NVANHNNSNHGN	32
P10	<u>SYNNNNHVSNRN</u>	34 (no dentro de la invención)
Consenso rico en asparagina	xNNNxNNxNNNN	14

Se sintetizó un péptido de 12 aminoácidos (P8) basado en la secuencia del fago y se ensayó respecto a la inhibición de la unión del P8 del fago a IgM^{CM-22} (figura 6B). La titulación de cantidades crecientes del péptido P8 dio una inhibición del 50% a una concentración estimada de 10 μ mol. Este ensayo indica una avidéz global de unión razonable basada en los múltiples sitios de unión expresados en la superficie del fago. Este resultado sugiere que la unión de IgM^{CM-22} al P8 de fago fue específica para la región del péptido y que el péptido sintético podría usarse como un mimotopo del antígeno real. Para caracterizar más la unión del péptido P8 a IgM^{CM-22}, se revistieron placas ELISA con el péptido y se ensayaron con IgM^{CM-22} o IgM^{CM-75} testigo respecto a la unión (figura 6C). A la menor concentración de 1 μ g/mL, nada de IgM se unió por encima del ruido de fondo. Sin embargo, los tres resultados sugieren que el péptido P8 se une específicamente a IgM^{CM-22} y puede usarse para la identificación del antígeno real.

Ejemplo 9: el péptido P8 rico en asparagina bloquea la RI intestinal

Estudios previos han demostrado que la RI intestinal en ratones RAG-1^{-/-} era dependiente de IgM y que IgM^{CM-22} sola fue suficiente para restaurar la lesión. Como se esperaba, la reconstitución de ratones RAG-1^{-/-} con IgM^{CM-22} pero no con disolución salina antes de la reperusión dio lugar a RI (figura 7A(i) y figura 7B). En contraste, la mezcla de IgM^{CM-22} con P8 antes de la inyección en ratones isquémicos bloqueó significativamente la lesión aparente (puntuación patológica

media 6 ± 3 frente a 31 ± 13 ; $p < 0,001$) (figura 7A(ii) y figura 7B). La titulación previa del péptido con IgM^{CM-22} sugirió que una concentración óptima de 10 μ M de P8 era suficiente para bloquear 50-100 μ g de IgM^{CM-22} (0,1-0,2 μ M).

Los análisis inmunohistológicos de secciones seriales de tejido intestinal sometido a reperusión (yeyuno) tras RI identificaron la co-localización de IgM y el complemento C4 y C3 dentro de las microvellosidades en ratones RAG-1^{-/-} reconstituidos con IgM^{CM-22} (figura 7Ci-iv). En contraste, las secciones preparadas a partir de ratones que recibieron P8 no mostraron ninguna evidencia de unión de IgM o del complemento (figura 7Cv-viii). No se observó ninguna unión de IgM o del complemento con IgM^{CM-31} testigo o ratones RAG-1^{-/-} reconstituidos sólo con disolución salina (Zhang et al. (2004) *PNAS USA* 101: 3886-91). Por tanto, P8 bloquea la unión de IgM^{CM-22} y la inducción de lesión *in vivo*.

La identificación de un único anticuerpo IgM natural que podría iniciar la RI en ratones RAG-1^{-/-} condujo a la cuestión general del número de posibles neo-epitopes expresados en tejidos isquémicos y el correspondiente número de clones patógenos de IgM en el repertorio de ratones de tipo silvestre (WT). Podría predecirse que el número de anticuerpos es limitado basándose en la comprensión actual de que el repertorio de IgMs naturales es relativamente pequeño. Herzenberg et al, *Immunol Today* 14: 79-83, discusión 88-90, 1993; Arnold et al., *J Exp Med* 179: 1585-1595, 1994. Por otra parte, los ligandos de anticuerpos IgM naturales son considerados estructuras muy conservadas y también probablemente son de número limitado. Para ensayar si P8 representaba un mimotopo de un auto-antígeno principal se pretrataron ratones WT con P8 (aproximadamente 10 μ M) cinco minutos antes de la reperusión en el modelo intestinal. Los análisis de tejidos de yeyuno de ratones tratados con disolución salina o con un péptido testigo antes de la reperusión identificaron, como se esperaba, una lesión significativa de las microvellosidades (figura 7Aiii). En contraste, el pretratamiento de ratones WT con P8 cinco minutos antes de la reperusión bloqueó la lesión aparente (puntuación patológica media 5 ± 3 frente a 24 ± 16 y 23 ± 19 ; $p < 0,005$ y $0,027$, respectivamente) (figura 7A(iv) y figura 7B). Como se esperaba, IgM, C4 y C3 se co-localizaron dentro de las microvellosidades de ratones WT tratados contra RI (figura 7Cix-xii). En contraste, no se observó ningún depósito aparente de IgM o del complemento en tejidos sometidos a reperusión de ratones a los que se administró P8 (figura 7Cxiii-xvi). Estos resultados sugieren que el número de epítopes clave requerido para iniciar la RI es limitado ya que un único péptido bloquea la lesión y la deposición de IgM y del complemento.

Ejemplo 10: inmunoprecipitación de auto-péptidos con IgM^{CM-22}

Usando la secuencia de aminoácidos de P8, una búsqueda de homología de la base de datos genómica no reveló ninguna identidad exacta. Por lo tanto, se usó un enfoque de inmunoprecipitación para identificar el o los antígenos de la isquemia en ratones RAG-1^{-/-} reconstituidos con IgM^{CM-22}.

Los ratones RAG-1^{-/-} se reconstituyeron con una cantidad óptima de IgM^{CM-22}, se trataron contra la isquemia intestinal y se sometieron a reperusión durante períodos de tiempo variables, es decir, 0 minutos ó 15 minutos antes de cosechar los tejidos. Se aislaron inmunocomplejos de antígeno IgM de lisados de yeyuno en los momentos variables y se fraccionaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Los análisis de los geles teñidos indicaron bandas comunes de bajo peso molecular en todos los momentos (figura 8a). Sin embargo, a los 15 minutos se identificó una banda de alto peso molecular (> 200 kD) (figura 8A).

Se cortaron bandas de proteínas de los geles teñidos, se digirieron enzimáticamente y los péptidos se analizaron por espectrometría de masas en tándem como se describe en Cox et al., *Mol Cell Proteomics* 2: 1188-1197, 2003. Los análisis de los péptidos eluidos indicaron que las bandas comunes a aproximadamente 25, 50 y 75 kDa representaban la cadena ligera (Lc) de la inmunoglobulina, la cadena pesada (Hc) de IgG y Hc de IgM, respectivamente. Los análisis de la banda de alto peso molecular dieron secuencias de péptidos homólogas a los isomorfos A y C del tipo II de la cadena pesada de miosina no muscular (tabla 5).

Tabla 5: resultados de la espectrometría de masas

Proteínas emparejadas	Espectrometría de masas de los péptidos secuenciados
<p>Cadena pesada II-A de miosina no muscular de ratón (gi/20137006; n° de Acceso al GenBank™: NP_071855)</p> <p>Puntuación total = 130; péptidos iguales = 6</p>	<p>VVFQEFR (MS-1; SEQ ID NO: 39)</p> <p>CNGVLEGIR (MS-2; SEQ ID NO: 40)</p> <p>KFDQLLAEEK (MS-3; SEQ ID NO: 41)</p> <p>KFDQLLAEEK</p> <p>EQADFAIEALAK (MS-4; SEQ ID NO: 42)</p> <p>QLLQANPILEAFGNAK (MS-5; SEQ ID NO: 43)</p>
<p>Cadena pesada II-c de miosina no muscular de ratón (gi/33638127; n° de Acceso al GenBank™: AAQ24173)</p> <p>Puntuación total = 133; péptidos iguales = 7</p>	<p>CNGVLEGIR</p> <p>VKPLLQVTR (MS-6; SEQ ID NO: 44)</p> <p>KFDQLLAEEK</p> <p>KFDQLLAEEK</p> <p>EQADFALEALAK</p> <p>LAQAEELQEQESR (MS-7; SEQ ID NO: 45)</p> <p>QLLQANPILEAFGNAK (MS-8; SEQ ID NO: 46)</p>

* La puntuación es $-10\log(P)$, en la que P es la probabilidad de que el emparejamiento sea un suceso al azar. Las puntuaciones de los iones individuales > 53 indican identidad u homología extensa ($p < 0,05$).

5 En experimentos similares usando lisados preparados a partir de ratones WT tratados durante 3 horas en RI intestinal, también se observó una banda de tamaño similar a 200 kD y el análisis de la secuencia identificó péptidos de NMHC-A y C.

10 Se han identificado tres formas (A, B y C) de NMHC tipo II en el genoma de ratón y de ser humano (Golomb et al., J Biol Chem 279: 2800-2808, 2004; Kelley et al., J Cell Biol 134: 675-687, 1996). Todas las células eucariotas expresan NMHC tipo II pero la distribución de las tres formas varía. NMHC-II A y B son aproximadamente 85% homólogas; mientras que NMHC-II C es aproximadamente 65% similar (Golomb et al., J Biol Chem 279: 2800-2808, 2004). Los tres isotipos están muy conservados entre ratones y seres humanos.

15 Para confirmar la unión de IgM^{CM-22} a NMHC tipo II se usó un enfoque ELISA. Se revistieron placas con anticuerpo específico de cada una de las tres formas de NMHC o con anticuerpo pan-miosina para capturar el antígeno relevante en lisados preparados a partir de yeyuno de ratones RAG-1^{-/-}. Subsiguientemente, se añadieron IgM^{CM-22} o IgM^{CM-31} y luego se desarrollaron con un anticuerpo IgM anti-ratón marcado. Se observó unión de IgM^{CM-22} por encima del ruido de fondo, pero no de IgM^{CM-31}, a las tres formas de los isomorfos de NMHC-II (figura 8B). El análisis de la secuencia combinada y los resultados ELISA muestran que IgM^{CM-22} reconoce una región conservada de la NMHC tipo II.

20 Para determinar si la miosina está expuesta a anticuerpo circulante tras la isquemia se reconstituyeron ratones RAG-1^{-/-} con una fracción de IgG purificada de la cadena pesada de conejo anti-pan miosina. Los análisis de tejidos de ratones RAG-1^{-/-} falsamente tratados tras la reconstitución con IgG de conejo no mostró ninguna evidencia de lesión o deposición de IgG. En contraste, los ratones RAG-1^{-/-} isquémicos reconstituidos con la IgG pan-miosina antes de la reperusión desarrollaron una RI significativa en comparación con los testigos reconstituidos con disolución salina (33 ± 11 frente a 11 ± 8 , $p < 0,028$) (figura 8C). Por consiguiente, la miosina está expuesta a anticuerpos en circulación tras la isquemia.

25 La comparación de las secuencias de los tres isomorfos NMHC-II con la secuencia del péptido P8 identificó una región de evidente homología (tabla 6). Las tres formas incluyen un resto de NxxxxNxNx que tiene similitud con la secuencia de P8. Se preparó una secuencia de auto-péptido de 12 aminoácidos (N2) (isomorfo de NMHC-II C) para un estudio adicional.

Tabla 6: secuencia homóloga conservada en NMHC-II A-C

Clon de fago	Secuencia
P8	NGNNVNGNRNNN (SEQ ID NO: 30)
Consenso	xNNNx(N/D)NxN(N/D)N(N/V) (SEQ ID NO: 14)
NMHC-II	Secuencia
Ratón-IIA (542-556)	LMKNMDPLNDI (SEQ ID NO: 36)
Ser humano-IIA (585-596)	LMKNMDPLNDI
Ratón-IIB (592-603)	LMKNMDPLNDNV (N2; SEQ ID NO: 38)
Ser humano-IIB (592-603)	LMKNMDPLNDNV
Ratón-IIC (607-619)	LMKNMDPLNDNV (N2; SEQ ID NO: 38)
Ser humano-IIC (611-622)	LMKNMDPLNDNV

Para ensayar que esta región se une a IgM^{CM-22} se usó análisis por resonancia de plasmones superficiales (figura 9). Se inyectó el péptido N2 sobre una superficie condensada con IgM^{CM-22} (figura 9A) y se generó una respuesta robusta, la cual correspondió a una K_D de $123 \pm 61 \mu\text{M}$ (media \pm SD, $n = 2$) que se calculó a partir de las concentraciones respuesta en estado estacionario (figura 9C). En contraste, no se observó ninguna unión cuando se inyectó un péptido testigo sobre la superficie específica condensada con IgM (figura 9B) o cuando el péptido N2 se inyectó sobre una superficie condensada con IgM^{CM-31} testigo (figura 9D).

Ejemplo 11: el auto-péptido N2 bloquea la RI intestinal

Para ensayar la unión funcional de N2 con IgM patógena se mezclaron aproximadamente 100 nmoles del péptido (o de disolución salina testigo) con IgM^{CM-22} antes de la reconstitución de ratones RAG-1^{-/-} y del tratamiento en el modelo RI. Los análisis de histología de secciones de tejidos preparadas a partir de yeyuno sometido a reperusión de ratones tratados con IgM^{CM-22} y disolución salina identificaron lesión y deposición de IgM y del complemento tal y como se esperaba (figura 5Ai y 5B). En contraste, la mezcla del péptido N2 con IgM^{CM-22} antes de la reperusión protegió de la lesión (puntuación patológica media 13 ± 8 frente a 31 ± 10 ; $p < 0,049$) (figura 10Aii y 10B). Además, no se observó ninguna deposición de IgM y del complemento en yeyuno sometido a reperusión cuando IgM^{CM-22} se mezcló con el péptido N2 antes de la inyección en ratones RAG-1^{-/-} (figura 10Ci-viii). Por tanto, como se observó con el péptido sintético P8, el auto-péptido N2 bloqueó la unión funcional de IgM^{CM-22} *in vivo*.

Para ensayar si el auto-péptido N2 representa el principal auto-epítotope en la RI intestinal, se trataron ratones WT con aproximadamente $40 \mu\text{M}$ del péptido sintético P8 antes de la reperusión en el modelo intestinal. Los análisis histológicos de secciones de tejidos de ratones WT tratados con disolución salina identificaron lesión y deposición de IgM y del complemento tal y como se esperaba (figura 10Aiii y 10Cix-xii). En contraste, el tratamiento de ratones WT con el auto-péptido N2 bloqueó tanto la lesión (puntuación patológica media 8 ± 5 frente a 22 ± 17) como la deposición de IgM y del complemento (figura 10Aiv; figura 10B; figura 10Cxi-xvi). Estos resultados sugieren que una región conservada dentro de las proteínas NMHC tipo II representa el epítotope principal para la unión de IgM natural tras la isquemia en el modelo intestinal.

Equivalentes

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de averiguar usando no más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en la presente memoria.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado, el cual codifica un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos la cual es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36 ó 38.
- 5 2. El ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, el cual codifica un péptido el cual consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36 ó 38.
3. El ácido nucleico aislado según la reivindicación 2, en la que el ácido nucleico es SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 35 ó 37.
4. El ácido nucleico aislado según cualquier reivindicación precedente operablemente conectado a un promotor.
5. Una molécula de ácido nucleico aislada, seleccionada del grupo que consiste en:
 - 10 a) Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos la cual es al menos 96% idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 11;
 - b) Una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 11;
 - 15 c) Una molécula de ácido nucleico que se hibrida con el complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 ó SEQ ID NO: 7 en condiciones rigurosas;
 - d) Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 ó SEQ ID NO: 12.
6. Un vector, que comprende el ácido nucleico de cualquier reivindicación precedente.
7. Una célula huésped aislada, que comprende el vector según la reivindicación 6.
- 20 8. Una composición que comprende un péptido, el cual consiste en una secuencia de aminoácidos la cual es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36 ó 38.
9. La composición según la reivindicación 8, en la que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36 ó 38.
10. La composición según la reivindicación 8 ó 9, en la que el péptido está pegilado.
- 25 11. La composición según la reivindicación 8 ó 9, en la que el péptido está marcado con un marcador detectable.
12. La composición (a) que comprende un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36 ó 38, o (b) según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para tratar una enfermedad o trastorno inflamatorio en un sujeto.
- 30 13. La composición según la reivindicación 12, en la que la enfermedad o trastorno inflamatorio es una lesión por reperfusión.
14. La composición según la reivindicación 12 ó 13, en la que el sujeto es un mamífero.
15. La composición según la reivindicación 14, en la que el mamífero es un ser humano.
16. El uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno inflamatorio en un sujeto.
- 35 17. Un polipéptido aislado, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 12.
18. Una inmunoglobulina natural aislada, la cual es producida por una célula que tiene el número de depósito ATCC PTA-3507.

FIGURA 1A

```

<----- FWR1 ----->
CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATT TCC

----- CDR1 -----> <-----
TGC AAA GCT TCT GGC TAC GCA TTC AGT AGC TAC TGG ATG AAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA

----- FWR2 -----> CDR2
AAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CAG ATT TAT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AAC TAC AAC GGA

----- FWR3 ----->
AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC

-----> D
AGC AGC CTG ACC TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA GAA GAT TAC TAC GGT AGT

<----- J ----->
GAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC ACA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT AAG CTG GCT

TTT TTC TTT CTG CAC ATT CCA TTC TGA (SEQ ID NO:1)

```

*

FIGURA 2B

-----FWR1-----> <-----CDR1-----> <-----FWR2----->
IVMTQSAASLAVSLGQRATISY RASKSVSTSGYSYMH WNQKPGQPPRLLIY

<-CDR2-> <-----FWR3----->
LVSNLES GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC QHIRE

<-----J----->
LTRSEGGPSWK* (SEQ ID NO:8)

FIGURA 2A

```

<----- FWR1----->
ATT GTG ATG ACC CAG TCT GCT GCT TCC TTA GCT GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCA TAC

      CDR1----->
AGG GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC TGG AAC CAA CAG AAA CCA GGA

      CDR2----->
FWR2----->
CAG CCA CCC AGA CTC ATC TAT CTT GTA TCC AAC CTA GAA TCT GGG GTC CCT GCC AGG TTC AGT

      FWR3----->
GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAT GCT GCA ACC

      J-----*
TAT TAC TGT CAG CAC ATT AGG GAG CTT ACA CGT TCG GAG GGG GGA CCA AGC TGG AAA TAA (SEQ ID NO:7)
    
```

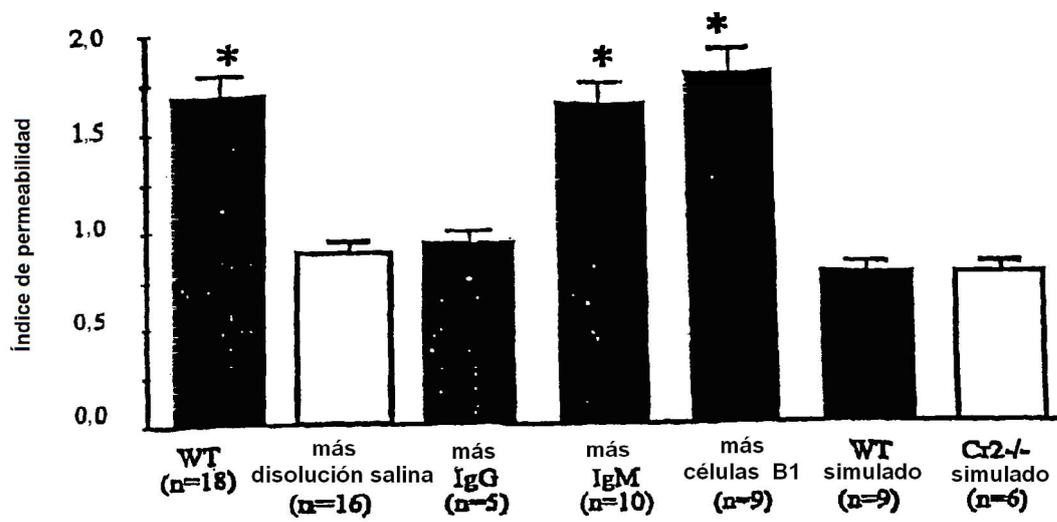
FIGURA 2B

```
-----FWR1-----> <-----CDR1-----> <-----FWR2----->
IVMTQSAASLAVSLGQRATISY RASKSVSTSGYSYMH WNQQKPGQPPRLLIY

<-CDR2-> <-----FWR3----->
LVSNLES GVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYC QHIRE

<-----J----->
LTRSEGGPSWK* (SEQ ID NO:8)
```

FIGURA 3



* $p < 0,00001$

FIGURA 4

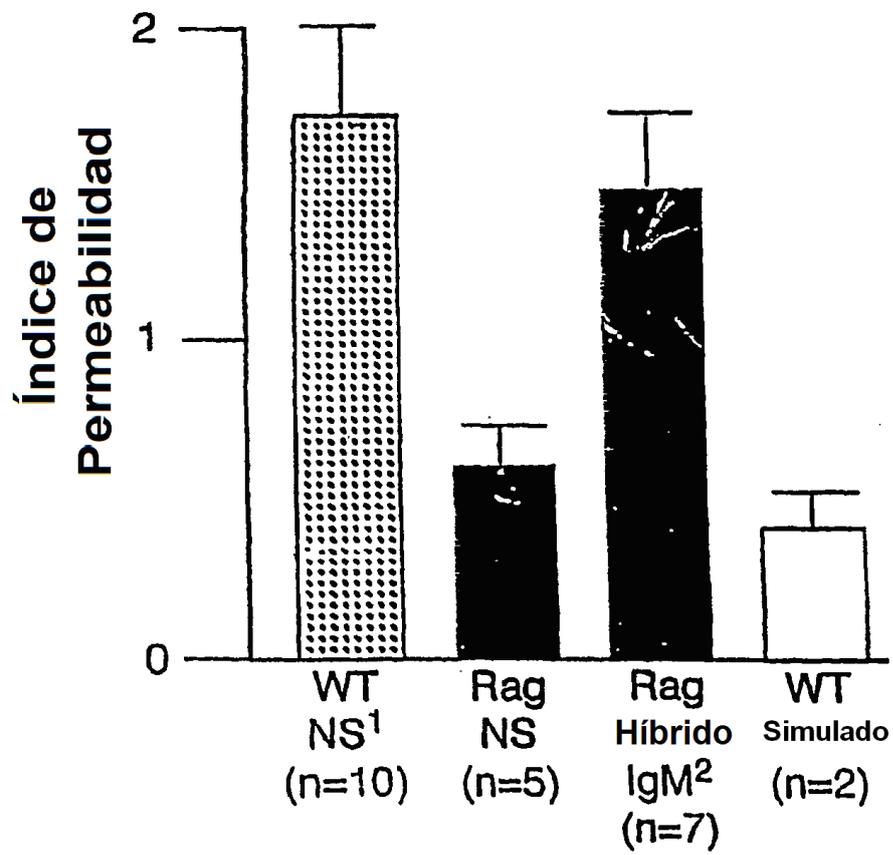


FIGURA 5

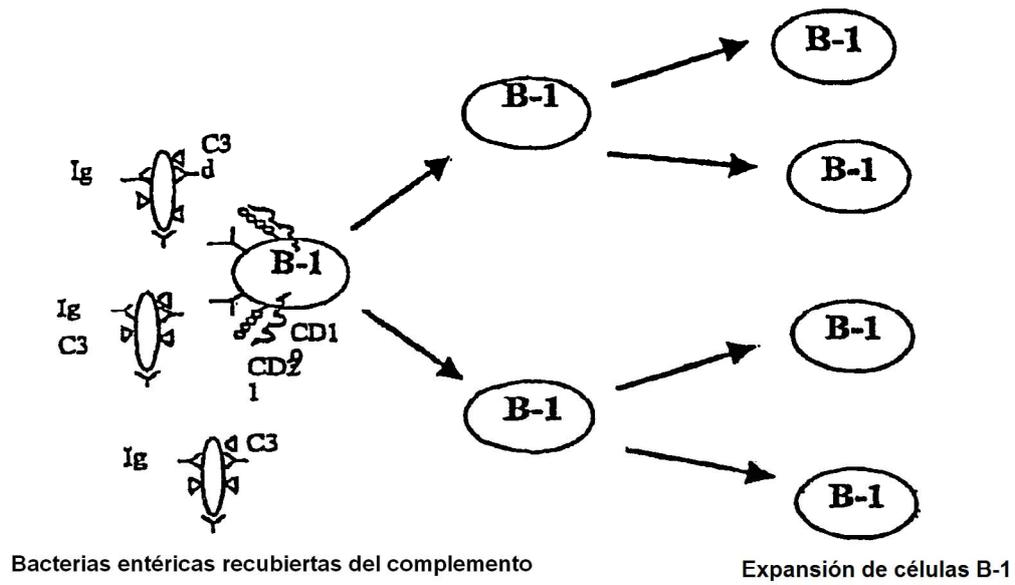


FIGURA 6

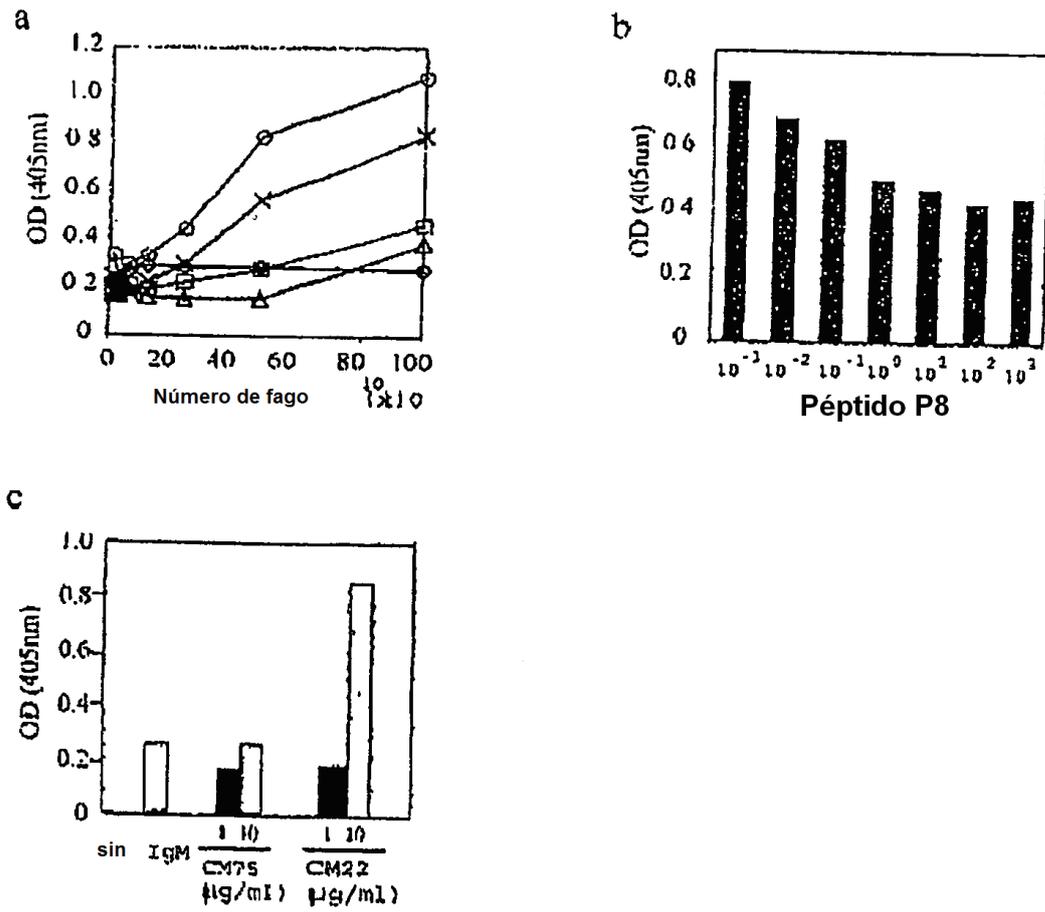


FIGURA 7

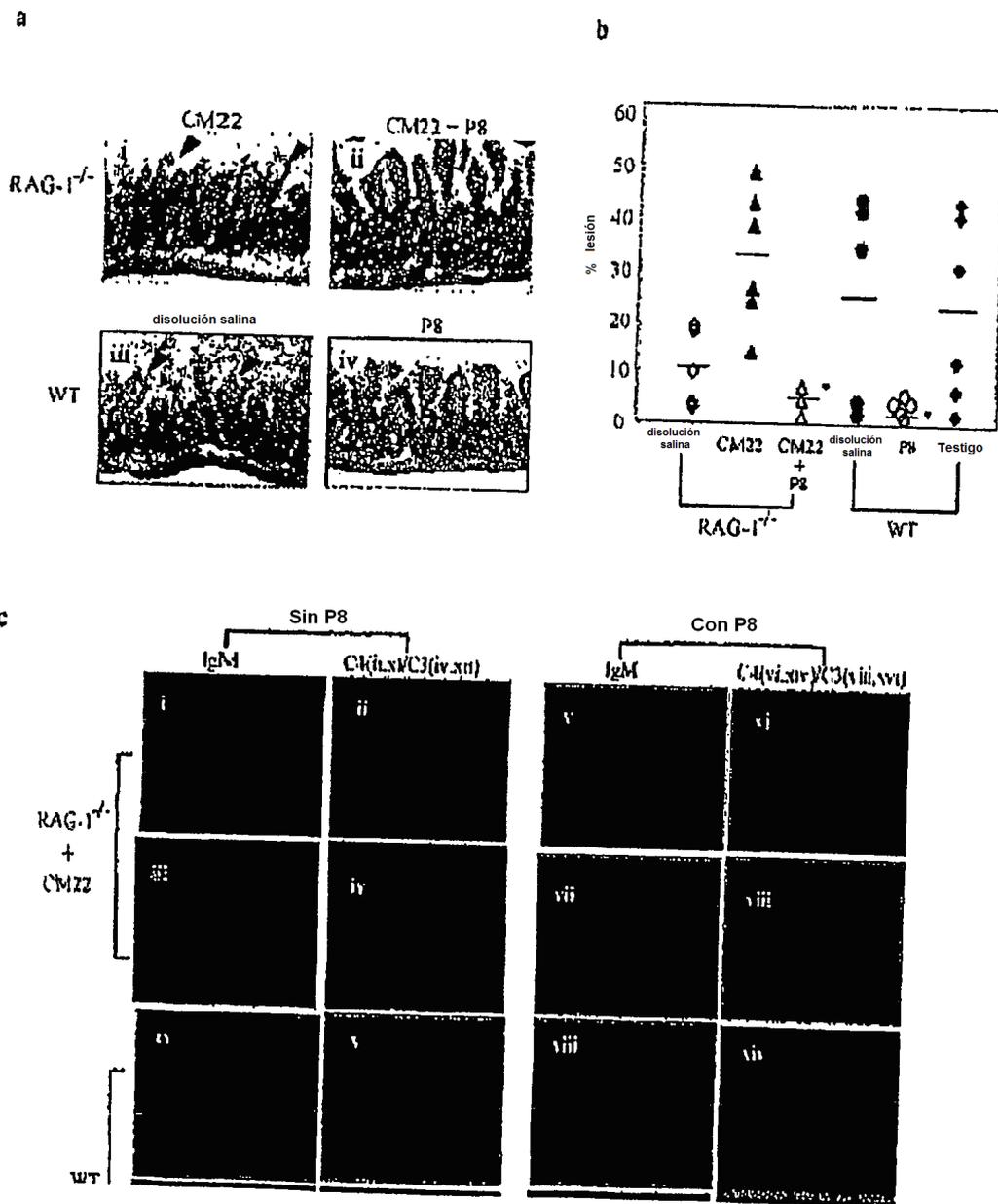


FIGURA 8

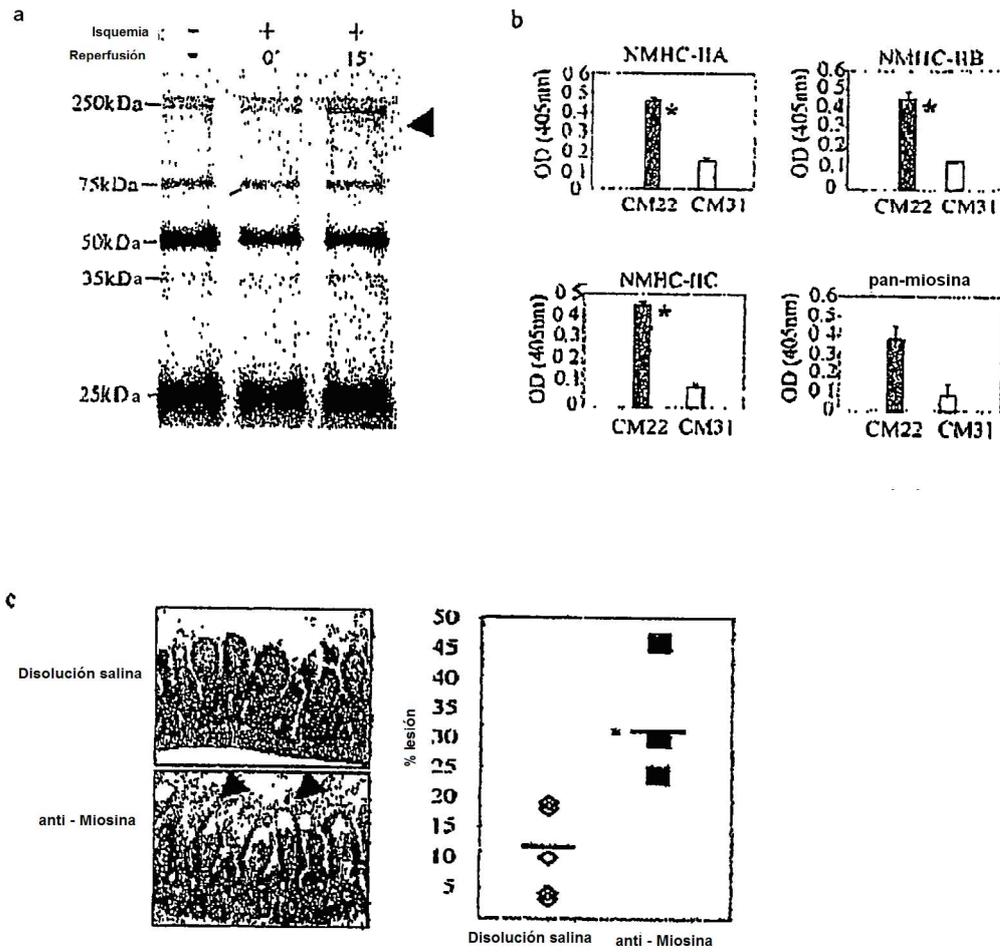


FIGURA 9

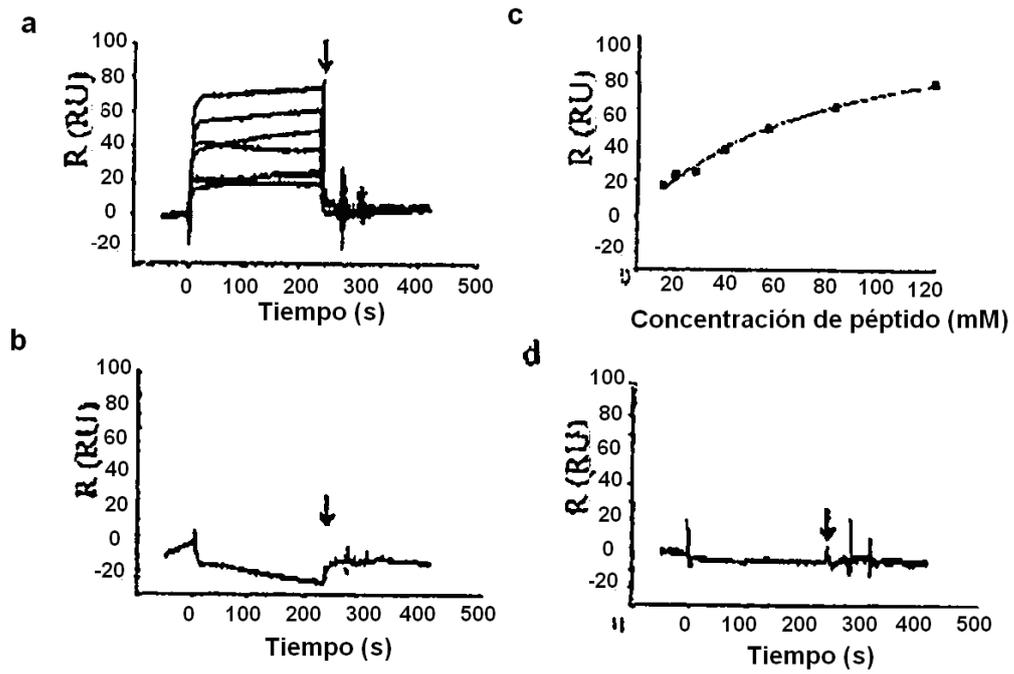


FIGURA 10

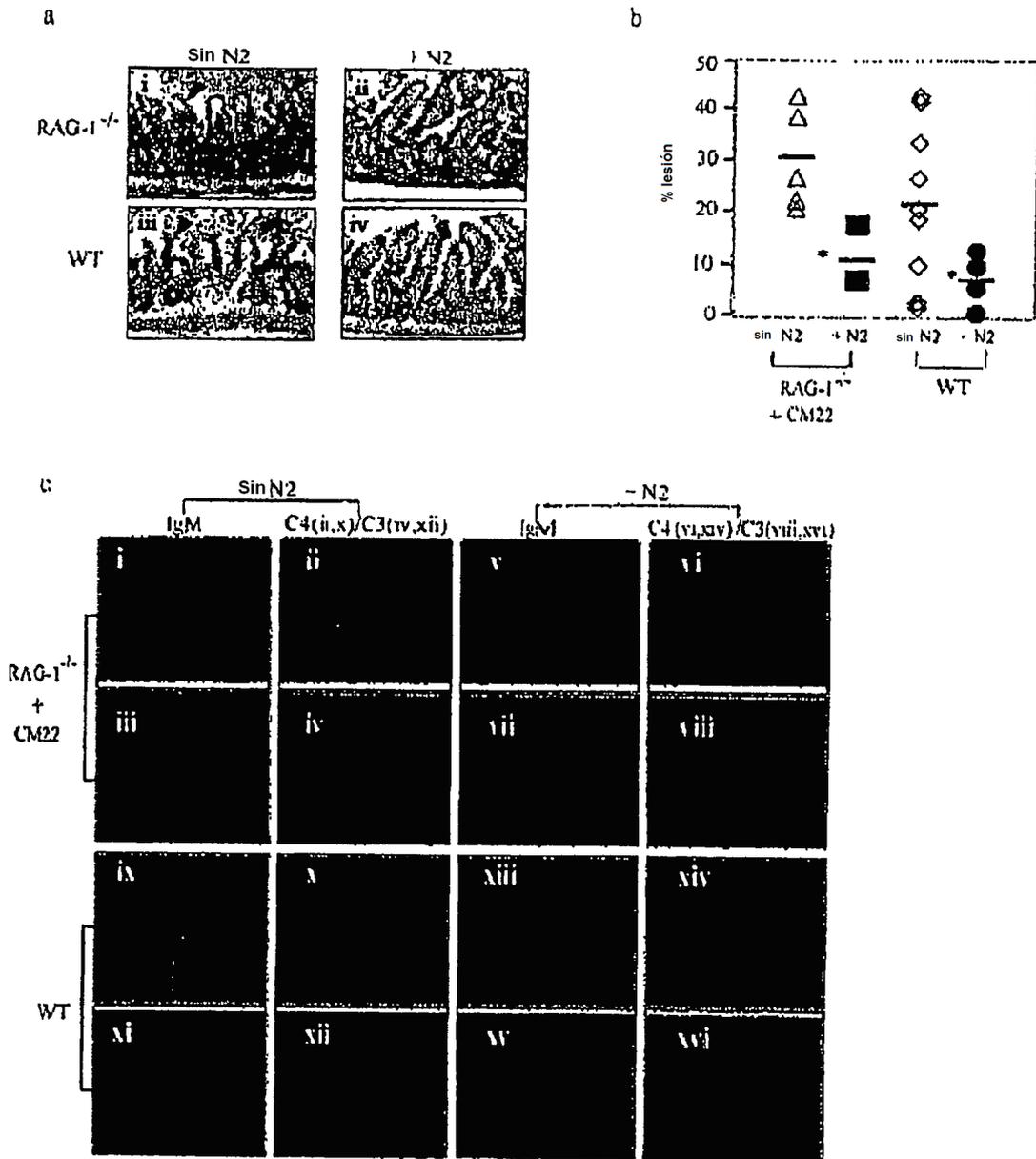


FIGURA 11

(A)

```

1  tgggcagggc  acggaaggct  caagaacctg  acctgctgca  gcttccagtc  tcgcggttgc
61  cccacccccg  cgcgcccgcc  gagegctcga  gaaagtccac  tcggaagaac  cagcgctgt
121  tccccgggca  gaccaggtt  caggtcctgg  ccgcaagtca  ccattggctca  agctgactgca
181  gacaagtacc  tctatgtgga  taaaaacttc  atcaataacc  cgctggccca  agctgactgg
241  gctgccaaga  agttggtatg  ggtgcttcc  agcaagaatg  gcttgaacc  agctagctc
301  aaggaggagg  tgggagaaga  ggccattgta  gagctggtag  agaatgggaa  gaaggtgaag
361  gtgaacaagg  acgacatcca  gaagatgaac  ccacccaagt  tctccaagg  ggaggacatg
421  gcagagctca  cgtgcctcaa  cgaagcttcg  gtgctgcaca  acctcaagga  gcgatactac
481  tcagggtta  tctacacct  ttcaggcctg  ttctgtgtgg  tcatcaacc  ttataagaac
541  ctgccatct  actcagagga  gatcgtggag  atgtacaagg  gcaagaagag  gcaagagatg
601  ccaccacaca  tctacgccat  cacagatact  gcctaccgga  catgatgca  ggaccgggaa
661  gatcagtcca  tcctgtgcac  gggggagtct  ggagcaggg  agacagagaa  caccaagaaa
721  gcatccagt  acctggcaca  tgtggctcc  tcacacaaga  gcaagaagga  ccagggggag
781  ttggagcggc  agctgtaca  ggccaacct  atoctagagg  ccttgggaa  cgccaagacg
841  gtgaagaatg  acaactctc  tcgattcgg  aaattcattc  gtatcaact  tgatgtcaat
901  ggctacattg  ttggtgcaa  cattgagact  tatcttctg  agaaatctc  tgctatccgc
961  caagccaaag  aggagcggac  cttccacatc  ttctactacc  tgctgtctg  ggccggagaa
1021  cacctgaaga  ctgatctct  gttggagcca  tacaacaaat  accgcttct  gtccaacggg
1081  cacgtcacca  tcctgggca  gcaggacaag  gacatgttcc  aggagacaat  ggaggccatg
1141  agaattatgg  gtatcccaga  ggtgagcag  atgggcttgc  tgccggctc  ctctggggtc
1201  cttcagcttg  gcaacattgc  cttcaagaag  ggcgggaaca  ctgaccagg  ctccatgccg
1261  gacaacacag  ctgctcaaaa  ggtgtcccac  ctctgggga  tcaatgtgac  cgacttcacc
1321  agaggcatcc  tcacccacg  catcaagggt  ggcagagact  atgtgcagaa  ggcgcagact
1381  aaagagcagg  ctgactttgc  cattgaggcc  ttggccaagg  ctacctatga  gccgatgttc
1441  cgctggctgg  tgcttcgcat  caacaaagct  ctggacaaga  ccaagaggca  gggcgctca
1501  ttatcgggga  tcctggacat  cgctggctt  gagatcttt  atctgaactc  cttcgagcag
1561  ctgtgcatca  actacaccaa  cgagaagctg  cagcagctgt  tcaaccacac  catgttcac
1621  ctggagcagg  aggagtacca  gcgagaggg  atcgagtgga  acttcatcga  cttcggcctg
1681  gacctgcagc  cctgcatcga  cctcattgag  aagccggcgg  gtccccagg  catcctggcc
1741  ctgctagatg  aggagtctg  gttcctaag  gccactgaca  agagctctg  ggagaagggt
1801  gtgcaggagc  agggcacc  cccaagttc  cagaagcca  agcaactgaa  ggacaaggct
1861  gatttctgca  ttatccacta  tgccggcaag  gtggactata  aagctgacga  gtggctgatg
1921  aagaacatgg  acccctgaa  cgacaacatc  gccacgctgc  tcaccagtc  ctgacaaag
1981  ttgtctctg  agctgtggaa  ggatgtggat  cggatcattg  gcttggacca  agtggctgga
2041  atgtccgaga  cagcactacc  tggctcctt  aagaccgga  agggcatgtt  ccgtactgtc
2101  ggacagctgt  acaaggagca  gctggccaag  ctcatggcca  cgttgaggaa  taccaacccc
2161  aacttcgtgc  gctgcatcat  tccaacct  gagaagaagg  cgggcaaact  ggaccgcac
2221  ttggtgctgg  accagctgcg  ctgcaatggc  gtcttgagg  gcatccggat  ctgcccag
2281  ggcttccca  acaggggtg  cttccaggag  ttccggcaga  ggtatgagat  cctcaccccc
2341  aactccatcc  cgaagggtc  catggatggc  aagcaagcgt  gtgtgctcat  gatcaaagcc
2401  ttggagcttg  acagcaacct  gtaccgcatc  ggccagagca  aagtgttctt  ccgggcagga
2461  gtgctagccc  acctggagga  agagcgggac  ctgaagatca  ccgatgtcat  cattggcttc
2521  caggcctgct  gcaggggcta  cctggccagg  aaggcctttg  ccaagaggca  gcaacagctg
2581  accgcatga  aggtcctaca  gaggaactgt  gctgcgtacc  tcaggctgcg  caactggcag
2641  tggaggaggc  tcttccaaa  ggtcaagccc  ctggtgaact  caataagaca  tgaggatgag
2701  ctgttagcca  aggaggcgga  actgacaaag  gttcgagaga  aacatctggc  tgagagaaac
2761  aggtgacag  agatggagac  gatgcagtct  cagctcatgg  cagagaagct  gcagcttcag
2821  gagcagctgc  aggcggagac  agagctgtgt  gccaggctg  aggagctccg  ggcccgtctg
2881  acagcgaaga  agcaggagct  ggaggagatc  tgccatgacc  tggaggccag  ggtggaggag
2941  gaggaggagc  gctgccagta  cctgcaggcc  gagaagaaga  agatgcagca  gaacatccag
3001  gaacttgagg  agcagttgga  ggaggaggag  agcggccggc  agaagctgca  gcttgagaag
3061  gtgaccaccg  aggccaagct  gaagaactg  gaggaggacc  agatcatcat  ggaggaccag
3121  aactgcaaac  tggccaagga  gaagaactg  ctggaagaca  gtagtagtga  attcactacc

```

3181 aacctcatgg aagaggagga gaagtccaag agcctggcca agctcaagaa caagcacgag
3241 gcaatgatca cccacctgga agagcgcctc cgtagggagg agaagcagag gcaggagtgtg
3301 gagaagaccc gtcgcaagct ggagggagac tccacagacc tcagtgacca gattgtctgag
3361 ctccaggcgc agatagcaga gctcaagatg cagctggcca agaaggagga ggagtgcag
3421 gctgccttgg ccagagtgga agaagaagct gctcagaaga atatggccct gaagaagatc
3481 cgagaactgg aaactcagat ctctgagctc caggaggacc tggagtcgga gcgagcctcc
3541 aggaataaag ccgagaagca gaaacgggat c tgggagagg agctggaggc gctgaagaca
3601 gagctggagg acacgctgga ctccacggct gccagcagg agctgaggtc gaagcgtgag
3661 caggagggtga gcatcctgaa gaagactctg gaggacgagg ccaagacca tgaggcccag
3721 atccaggaga tgaggcagaa gcactcacag gctgtggagg agctggcaga tcagtggag
3781 cagacgaagc gggtaaaagc tacccttgag aaggcgaagc agaccctgga gaatgagcgg
3841 ggagagctgg ccaatgaggt gaaggccttg ctgcaaggca agggcgactc agagcacaag
3901 cgcaagaagg tggagggcga gctgcaagaa ctgcaaggtca agttcagcga gggagagcgc
3961 gtgcaaaccc aactggccga caaggtcacc aagctgcagg ttgaactgga cagtgtgacc
4021 ggtctcctta gccagctctga cagcaagtcc agcaagctta cgaaggactt ctctgcgctg
4081 gagtcccagc ttcaggacac acaggagtgt c tccaggagg agaaccggca gaagctgagc
4141 ctgagcacca agctcaagca gatggaggat gagaaaaact ccttcaggga gcagctggag
4201 gaggaggagg aggccaaagc caacttgag aagcagatcg ccacgctcca tgcccagggtg
4261 accgacatga agaagaagat ggaggacggg gtaggggtgc tggagactgc agaggaggcg
4321 aagcggaggc ttcagaagga cttggaagggc ctgagccagc ggcttgagga gaaggtggct
4381 gcctacgata agctggagaa gaccaagaca cggctgcagc aggagctgga cgacctgtg
4441 gttgacctgg accaccagcg gcagagcgtc tccaacctgg aaaagaagca gaagaagttc
4501 gaccagctcc tagccgagga gaagaccatc t cggccaagt atgcagagga gcgtgaccga
4561 gctgaggctg aggcccgctg gaaggagaca aaggcgtat cactggcccg ggcgcttgag
4621 gaggccatgg agcagaaggc agagctggag cggctcaaca agcagttccg cacggagatg
4681 gaggacctca tgagctccaa ggatgacgtg ggcaagagtg tccacgagct ggagaagtcc
4741 aagcgggctt tggagcagca ggtggaggag a tgaagacc agctggagga gctggaggat
4801 gagctgcagg ccacggagga tgccaagctc cgcctggagg tgaacctgca ggccatgaag
4861 gccagtttg agcgggatct gcagggccgg gatgaacaga gcgaggagaa gaagaagcag
4921 ctggctcagac aggtgcggga gatggaggcg gagctggagg atgagaggaa gcagcgtcc
4981 atggccatgg ccgcacgcaa gaaactggag a tggatctga aggacctgga ggcacacatt
5041 gatcacgcca ataagaaccg ggaagaggcc a tcaaacagc tgcggaagct tcaggcccag
5101 atgaaggact gcatgcggga gctggacgac a cgcgcgcct cccgggagga gctgctggcg
5161 caggccaagg agaatgagaa gaagctgaag agcatggagg ccgagatgat tcagctgcag
5221 gaggaactgg cagctgctga gcgtgctaag cgtcaggccc aacaggaacg ggacgagctg
5281 gctgatgaga tcgccaacag cagtggcaaa ggggccctag cattagagga gaagcggcga
5341 ctggaggccc gcattgccct gctggaggag gagctggagg aggaacaggg caacacggag
5401 ctgatcaacg atcggctgaa gaaggccaac ctgcaagatc accaaataaa caccgacctg
5461 aacctggaac gcagccacgc acagaagaat gagaatgccc gacagcagct ggaacgccag
5521 aacaaggagc tcaaggcaa gctgcaggaa atggagagtg ctgtcaagtc caaatacaag
5581 gcctccatcg cggccttggga ggccaaaatt gcacagctgg aggaacagct ggacaacgag
5641 accaaggagc gccaggcagc ctccaagcag gtgcgcccga cggagaagaa gctgaaggac
5701 gtgctgctgc aggtggagga cgagcggagg a acgcggaac agttcaagga ccaggctgac
5761 aaggcgtcca cccgctgaa gcagcttaaa cggcagctag aggaggctga agagaggcc
5821 cagcgggcca atgcctcacg ccggaagctg cagcgtgagc tggaaagtgc cacagagacc
5881 gctgatgcta tgaaccgca ggtcagctcc ctgaagaaca aactgaggcg tggggacctg
5941 ccatttgtcg tgactcggcg aattgttcgg a aaggcactg gcgactgctc agacgaggag
6001 gtcgacggta aagcagatgg ggccgatgcc aaggcagctg aataggagct tctcctgcag
6061 cccaggcggga tggacaaacg gctctgcctc cctcccaaa cctccacac ccctgccttg
6121 agactgctct gacctgtcc cctcctccc aaggccttc cgagggcatt ggcttctct
6181 gctgcagccc tccagtcct ccatacctt tgagaatctg ataccaaaga gtccaggctg
6241 gctcaggccg gatgaccac agggctctgt cctccttggc tgaagcagc ggtggtgggc
6301 aagaagggcg gccattggag taggcacaag agttttctat gaatctattt tgtcttcaga
6361 taaagatttt gatagctcag gcctctagta gtgtaccct ccccgacctc ggctgtcccc
6421 gtccccgctc cccctgctg ttggcaatca cacacggtaa cctcatacct gccctatggc
6481 cccctccct gggccctatt ggtccagaag gagcctctgt ctgggtgcag aacatggggc
6541 actctgggaa tcccccaact cccttctggg cagcactggt gcctctgctc ctccgactgt

6601 aaaccgtctc aagtgcaatg ccctccctc ccttgccaa ggacagaccg tcttggcacc
 6661 ggggcaaacc agacagggca tcagggccac tctagaaagg ccaacagcct tccgggtggct
 6721 tctcccagca ctctagggga ccaaatatat ttaatgggta agggacttgc agggcctggc
 6781 agccagaata tccaagggct ggagcccact gtgcgctctg gtgcctctcc taggactggg
 6841 gccaaaggtg gtcgagctgt gccaccact ctatagcttc aagtctgcct tccacaagga
 6901 tgcttttgaa agaaaaaaaa aggttttatt tttcccttct ttagtaagt gctctagttc
 6961 tgggtgtcct cactgccttg ccctggaact gtgttttagaa gagagtagct tgccctacaa
 7021 tgtctacact ggtcgctgag ttccctgcgc actgcacctc actgtttgta aatgctgtga
 7081 ttaggttccc ttatggcagg aaggcttttt ttttcttttt tttttctttt tctttttttt
 7141 ttttttaaag gaaaaccagt caaatcatga agccacatac gctagagaag ctgaatccag
 7201 gtcccaaagg cgctgtcata aaggagcaag tgggaccgc accccttttt ttatataata
 7261 caagtgcctt agcatgtgtc gcagctgtca ccactacagt aagctggttt acagatgttt
 7321 ccactgagcg tcacaataaa gagtaccatg tccta (SEQ ID NO: 47)

(B)

1 maqqaadkyl yvdknfinnp laqadwaakk lvwvpsskng fepaslkeev geeaivelve
 61 ngkkvkvknd diqkmppkf skvedmaelt clneasvlhn lkeryysgli ytysglfcvv
 121 inpyknlpiy seeivemykg kkrhempphi yaitdtayrs mmqdredqsi lctgesgagk
 181 tentkkviqy lahvasshks kkdqgelerq llqanpilea fgnaktvknd nssrfqkfir
 241 infdvngyiv ganietylle ksrairqake ertfhifyyl lsgagehlkt dlllepynky
 301 rflsnghvti pgqqdkdmfq etmeamring ipedeqmgll rvisgvlqlg niafkkernt
 361 dqasmpdnta aqkvshllgi nvtdftrgil tprikvgrdy vqkaqtkeqa dfaiealaka
 421 tyermfwrwlv lrinkaldkt krqgasfigi ldiagfeifd lnsfeqlcin ytneklqqlf
 481 nhtmfileqe eyqregiewn fidfgldlqp cidliekpag ppgilalld ecwfpkatdk
 541 sfvekvvqeq gthpkfqkpk qlkdkadfci ihyagkvdyk adewlmknmd plndniatl
 601 hqssdkfvse lwkdvdrig ldqvagmset alpgafktrk gmfrtvqgly keqlaklmat
 661 lrntnnpnfvvr ciipnehkka gkldphlvd qlrcngvleg iricrqqfnp rvvfqefrqr
 721 yeiltpnslp kgfmdgkqac vlmikaleld snlyriggsk vffragvlah leerdlkit
 781 dviigfqacc rgylarkafa krqqqltamk vlqrncaayl rlrnwqwwrl ftkvklplns
 841 irhedellak eaeltkvrek hlaaenrte metmqsqlma eklqlqeqlq aetelcaee
 901 elrarltakk qeleeichdl earveeeder cqylqaekkk mqgniqelee qleeeesarq
 961 klqlekvtte aklkkleedq iimedqnckl akekklledr vaefttnlme eeekskslak
 1021 lknkheamit dleerlrree kqrqelektr rklegdstdl sdqiaelqaq iaekmlqak
 1081 keelqaala rveeaaqkn malkkirele tqiselqedl eserasrnka ekqkrdlgee
 1141 lealkteled tldstaaqqe lrskregevs ilkktledea ktheaqiqem rqkhsqavee
 1201 ladqleqtkr vkatlekakq tlenergela nevkallqgk gdsehkrkkv eaqlqelqvk
 1261 fsegervrte ladkvtklqv eldsvtglls qsdsksskl kdfsalesql qdtqellqee
 1321 nrqklslstk lkqmedekns freqleeeee akrnlekqia tlhaqvtdmk kkmedgvgcl
 1381 etaeeakrrl qkdleglsqr leekvaaydk lektktrlqg elddllvld hqrqsvsnle
 1441 kkqkkfdqll aeektisaky aeerdracae areketkals laraleeame qkaelerlnk
 1501 qfrtemedlm sskddvgksv helekskral eqqveemktq leeledelqa tedaklrlev
 1561 nlqamkaqfe rdlqgrdeqs eekkkqlvrq vremaealed erkqrs mama arkklemdlk
 1621 dleahidtan knreeaikql rklqagmkdc mrelddtras reeilqake nekkksmea
 1681 emiqlqeela aaerakrqaq qerdelaide anssgkqala leekrrlear ialleelee
 1741 eggntelind rlkkanlqid qintdlnler shaqknenar qqlerqnel kaklqemesa
 1801 vkskykasia aleakiaqle eqlnetker qaaskqvrrt ekkkdvllq vederrnaeq
 1861 fkdqadkast rlkqlkrqle eaeaaqran asrrklqrel edatetadam nrevsslknk
 1921 lrrgdplfvv trrivrkgtg dcsdeevdkg adgadakaee (SEQ ID NO: 48)

FIGURA 12

(A)

```

1  atacgactca ctatagggcg atcagggtgct ggaaagaagg ctaagcaagg ctgacctgct
61  gcagctccc cctcgtgctc tcgccccacc cggccgccc ccgagcgctc gagaaagtcc
121 tctcgggaga agcagcgcct gttcccgggg cagatccagg ttcaggctct ggctataagt
181 caccatggca cagcaagctg ccgataagta tctctatgtg gataaaaact tcatcaacaa
241 tccgctggcc caggccgact gggctgccaa gaagctggta tgggtgctt ccgacaagag
301 tggctttgag ccagccagcc tcaaggaggga ggtgggcgaa gaggccatcg tggagctggt
361 ggagaatggg aagaaggtga aggtgaacaa ggatgacatc cagaagatga acccgcccaa
421 gttctccaag gtggaggaca tggcagagct cacgtgcctc aacgaagcct cgggtgctgca
481 caacctcaag gagcgttact actcagggct catctacacc tattcaggcc tgttctgtgt
541 ggtcatcaat ccttacaaga acctgcccac ctactctgaa gagattgtg aaatgtacaa
601 gggcaagaag aggcacgaga tgccccctca catctatgcc atcacagaca ccgcctacag
661 gagtatgatg caagaccgag aagatcaatc catcttgtgc actggtgaat ctggagctgg
721 caagacggag aacaccaaga aggtcatcca gtatctggcg tacgtggcgt cctcgcaaa
781 gagcaagaag gaccagggcg agctggagcg gcagctgctg caggccaacc ccatcctgga
841 ggccttcggg aacgccaaga ccgtgaagaa tgacaactcc tcccgttcg gcaaatcat
901 tcgcatcaac tttgatgtca atggctacat tgttggagcc aacattgaga cttatctttt
961 ggagaatct cgtgctatcc gccaagccaa ggaagaacgg acctccaca tcttctatta
1021 tctcctgtct gggctggag agcacctcaa gaccgatctc ctggtggagc cgtacaacaa
1081 ataccgcttc ctgtccaatg gacacgtcac catccccggg cagcaggaca aggacatgtt
1141 ccaggagacc atggaggcca tgaggattat gggcatcca gaagaggagc aaatgggctt
1201 gctgcggtc atctcagggg ttcttcagct cggcaacatc gtcttcaaga aggagcggaa
1261 cactgaccag gcgtccatgc ccgacaacac agctgcccac aagggtgtcc atctctggg
1321 tatcaatgtg accgatttca ccagaggaat cctcaccctg cgcataaagg tgggagggga
1381 ttacgtccag aaggcgaga ctaaaagaca ggetgacttt gccatcgagg ccttggccaa
1441 ggcgacctat gagcggatgt tccgctggct ggtgctgctc atcaacaagg ctctggacaa
1501 gaccaagagg cagggcgctt ccttcacgg gatcctggac attgccggtt tcgagatctt
1561 tgatctgaac tcgtttgagc agctgtgcat caattacacc aatgagaagc tgcagcagct
1621 cttcaaccac accatgttca tctggagca ggaggagtac cagcgcgagg gcatcgagtg
1681 gaacttcatc gactttggcc tcgacctgca gccctgcatc gacctattg agaagccagc
1741 agggcccccg ggcattctgg ccctgctgga cgaggagtgc tggttcccc aagccaccga
1801 caagatcttc gtggagaagg tgatgcagga gcagggcacc caccacaagt tccaggacc
1861 caagcagctg aaggacaaag ctgatttctg cattatccac tatgccggca aggtggatta
1921 caaagctgac gagtggctga tgaagaacat ggatcccctg aatgacaaca tcgccacact
1981 gctccaccag tctctgaca agtttgtctc ggagctgtgg aaggatgtgg accgcatcat
2041 cggcctggac caggtggcgg gcatgtcggg gaccgcactg cccggggcct tcaagacgcy
2101 gaagggcatg ttccgcactg tggggcagct ttacaaggag cagctggcca agctgatggc
2161 tacgtgagg aacacgaacc ccaactttgt ccgctgcatc atcccaacc acgagaagaa
2221 ggcggcaag ctggaccegc atctcgtgct ggaccagctg cgctgcaacg gtgttctcga
2281 gggcatccgt atctgccgcc agggcttccc caacagggtg gtcttccagg agtttccgca
2341 gagatatgag atcctgactc caaactccat tcccagggtt tcatggagc ggaagcaggc
2401 gtgcgtgctc atgataaaaag ccctggagct cgacagcaat ctgtaccgca ttggccagag
2461 caaagtcttc ttccgtgccc gtgtgctggc ccacctggag gaggagcagc acctgaagat
2521 caccgacgct atcatagggg tccaggcctg ctgcaggggc tacctggcca ggaagcatt
2581 tgccaagcgg cagcagcagc ttaccgcatc gaaggctctc cagcggaaact gcgctgccta
2641 cctgaagctg cggaaactggc agtgggtggc gctcttacc aaggtaaacg cgctgctgca
2701 ggtgagccgg caggaggagg agatgatggc caaggaggag gagctggtga aggtcagaga
2761 gaagcagctg gctgcccgaga acaggctcac ggagatggag acgctgcagt ctcagctcat
2821 ggcagagaaa ttgcagctgc aggagcagct ccaggcagaa accgagctgt gtgccaggc
2881 tgaggagctc cgggcccggc tgaccgcaa gaagcaggaa ttagaagaga tctgccatga
2941 ctagagggc aggggtggag aggaggagg ggcgtgccag cacctgcagg cggagaagaa
3001 gaagatgcag cagaacatcc aggagcttga ggagcagctg gaggaggagg agagcggccg
3061 gcagaagctg cagctggaga aggtgaccac cgaggcgaag ctgaaaaagc tggaggagga
3121 gcagatcatc ctggaggacc agaactgcaa gctggccaag gaaaagaaac tgctggaaga

```

3181 cagaatagct gagttcacca ccaacct cac agaagaggag gagaaatcta agagcctcgc
3241 caagctcaag aacaagcatg aggcaat gat cactgacttg gaagagcgcc tccgcagggga
3301 ggagaagcag cgacaggagc tggagaa gac ccgccggaag ctggaggggag actccacaga
3361 cctcagcgac cagatcgccg agctcca ggc ccagatcgcg gagctcaaga tgcagctggc
3421 caagaaagag gaggagctcc aggccgc cct ggccagagtg gaagaggaag ctgccagaa
3481 gaacatggcc ctcaagaaga tccgggagct ggaatctcag atctctgaac tccaggaaga
3541 cctggagtct gagcgtgctt ccaggaa taa agctgagaag cagaaacggg accttggggga
3601 agagctagag gcgctgaaaa cagagtt gga ggacaogctg gattccacag ctgccagca
3661 ggagctcagg tcaaaacgtg agcaggagggt gaacatcctg aagaagacc tggaggagga
3721 ggccaagacc cacgaggccc agatcca gga gatgaggcag aagcactcac aggccgtgga
3781 ggagctggcg gagcagctgg agcagac gaa gcgggtgaaa gcaaacctcg agaaggcaaa
3841 gcagactctg gagaacgagc ggggggagct ggccaacgag gtgaagggtc tgcctcaggg
3901 caaaggggac tccgagcaca agcgcgaa gaa agtggaggcg cagctgcagg agctgcagg
3961 caagttcaac gaggagagc gcgtgcg cac agagctggcc gacaaggtca ccaagctgca
4021 ggtggagctg gacaacgtga cccggct tct cagccagtcc gacagcaagt ccagcaagct
4081 caccaaggac ttctccgccc tggagtc cca gctgcaggac actcaggagc tgcctcagga
4141 ggagaaccgg cagaagctga gcctgag cac caagctcaag caggtggagg acgagaagaa
4201 ttccctccgg gagcagctgg agggaggagg ggaggccaag cacaacctgg agaagcagat
4261 cgcaccctc catgccaggg tggccga cat gaaaaagaag atggaggaca gtgtgggggtg
4321 cctggaaact gctgaggagg tgaagaggaa ctccagaag gacctggagg gacctgagcca
4381 gcggcacgag gagaaggtgg ccgcta cga caagctggag aagaccaaga cgcggctgca
4441 gcaggagctg gacgacctgc tggtgga cct ggaccaccag cgcagagcg cgtgcaacct
4501 ggagaagaag cagaagaagt ttgacca gct cctggcggag gagaagacca tctctgcaa
4561 gtatgcagag gagcgcgacc gggctga ggc ggaggcccg gagaaggaga ccaaggctct
4621 gtcgctggcc cgggccctgg aggaagc cat ggagcagaag gcgagctgg agcggctcaa
4681 caagcagttc cgcacggaga tggaggacc cct tatgagctcc aaggatgatg tgggcaagag
4741 tgtccacgag ctggagaagt ccaagcggg cctagagcag caggtggagg agatgaagac
4801 gcagctggaa gagctggagg acgagct gca ggccaccgaa gatgccaaag tgcggttgga
4861 ggtcaacctg caggccatga aggccagtt cgagcgggac ctgcagggcc gggacgagca
4921 gagcagaggag aagaagaagc agctggt cag acaggtgcgg gagatggagg agatgctgga
4981 ggacgagag aagcagcgt cgatggc agt ggccgcccgg aagaagctgg cagtgccct
5041 gaaggacctg gagcgcaca togactc ggc caacaagaac cgggacgaag ccatcaaaaca
5101 gctgcggaag ctgcaggccc agatgaa gga ctgcatgcgc gagctggatg acaccgcgc
5161 ctctcgtgag gagatcctgg cccaggc caa agagaacgag aagaagctga agagcatgga
5221 ggccgagatg atccagtgc agggaggact ggcagcccg gagcgtgcca agcggcaggc
5281 ccagcaggag cgggatgagc tggctga cga gatccccaac agcagcggca aaggagccct
5341 ggcgttagag gagaagcggc gtctggaggc ccgcatcgcc cagctggagg aggagctgga
5401 ggaggagcag ggcaacacgg agctgat caa cgaccgctg aagaaggcca acctgcagat
5461 cgaccagatc aacaccgacc tgaacct gga gcgcagccac gcccagaaga acgagaatgc
5521 tcggcagcag ctggaacgcc agaacaagg gcttaaggtc aagctgcagg agatggaggg
5581 cactgtcaag tccaagtaca aggcctc cat caccgcctc gaggccaaaga ttgcacagct
5641 ggaggagcag ctggacaacg agaccaagg atgtgct get gcaggtggat gactgcaaac aggtgcgtc
5701 gaccgagaag aagctgaagg atgtgct get gcaggtggat gactgcaaac aggtgcgtc
5761 gcagtacaag gaccaggccg acaaggc atc taccgcctg aagcagctca agcggcagct
5821 ggaggaggcc gaagaggagg cccagcgggc caacgcctcc cgcgggaaac tgcagcgcga
5881 gctggaggac gccactgaga cggccga tgc catgaaccgc gaagtcaact ccctaaagaa
5941 caagctcagg cgcggggacc tgcctgt tgt cgtgccccgc cgaatggccc ggaaaggcgc
6001 cggggatggc tccgacgaag aggtaga tgg caaagcggat ggggctgagg ccaaacctgc
6061 cgaataagcc tcttctcctg cagcctg aga tggatggaca gacagacacc acagcctccc
6121 ctccacagac cccgcagcac gcctctccc acctctctgg gactgctgtg aacatgcctc
6181 ctccctgccct cgcgccgctc ccccatccc gtttccctcc aggtgtgtgt gagggcatt
6241 ggcttctctc gctgcacccc ctccagctc cctcccctgc tcagaatctg ataccaaga
6301 gacagggccc gggcccaggc agagagcag cagcaggctc ctgacctc tctgcaaaa
6361 aagcaacaaga tgttgaggcg agcaggcg ag cccccggg aggggcccaga gttttctatg
6421 aatctatctt tcttcagact gaggcct ttt ggtagtgcga gccccgcag tgcctcagct
6481 ccctgacgtc tgcaccagc gccccactc ctctctctt ctttctgtgt tgcatacaca
6541 cgtggtgacc tcacacaact ctgccccttg ggctccccc tcccattggt ctgggcccgc

```

6601 cagaaggagc aggccctggg cctccacctc tgtgcagggc acagaaggct ggggtggggg
6661 gaggagtgga ttcctcccca ccctgtccca ggcagcgcca ctgtccgctg tctccctcct
6721 gattctaaaa tgtctcaagt gcaatgcccc ctccccctct ttaccgagga cagcctgcct
6781 ctgccacagc aaggctgtcg gggtcgaagc ggaaaggcca gcagccttcc agtggcttct
6841 cccaacactc ttggggacca aatatattta atggttaagg gacttgtccc aagtctgaca
6901 gccagagcgt tagaggggccc ageggccctc ccaggcgatc ttgtgtctac tctaggactg
6961 ggcccgaggg tggtttacct gcaccgttga ctcagtatag tttaaaaatc tgccacctgc
7021 acaggtatct ttgaaagcaa aataaggttt tcttttttcc cctttcttgt aataaatgat
7081 aaaattccga gtctttctca ctgcctttgt ttagaagaga gtagctcgtc ctoactggtc
7141 tacactgggt gccgaattta cttgtattcc taactgtttt gtatatgctg cattgagact
7201 tacggcaaga aggcattttt tttttttaa ggaacaaac tctcaaatca tgaagtgata
7261 taaaagtctg atatgcctac aaagctctga attcaggtcc cagttgctgt cacaaaggag
7321 tgagtgaac tcccaccta ccccttttt tataataata aagtgcttta gcactgttg
7381 cagctgtcac cactacagta agctggttta cagatgtttt ccaactgagca tcacaataaa
7441 gagaacatg tgctaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa (SEQ ID NO: 49)

```

(B)

```

1 maqqaadkyl yvdknfinnp laqadwaakk lvwvpsdksq fepaslkeev geeaivelve
61 ngkkvkvnkd diqkmnppkf skvedmaelt clneasvlhn lkeryysgli ytysglfcv
121 inpyknlp iy seeivemykg kkrhempphi yaitdtayrs mmqdredqsi lctgesgagk
181 tentkkviqy layvasshks kkdqgelerq llqanpilea fgnaktvknd nssrfgkfir
241 infdvngyiv ganietylle ksrairake ertfhifyyl lsgagehkt dllepynky
301 rflsnghvti pgqqdkdmfq etmeamrimg ipeeeqmgll rvisgvlqlg nivfkkernt
361 dqasmpdnta aqkvshllgi nvtdftrgil tprikvgrdy vqkaqtkeqa dfaiealaka
421 tyermfrwlv lrinkaldkt krqgasfigi ldiagfeifd lnsfeqlcin ytneklqqlf
481 nhtmfileqe eyqregiewn fidfgldlqp cidliekpag ppgilallde ecwfpkatdk
541 sfvekvmqeq gthpkfqkpk qlkdkadfc ihyagkvdyk adewlmknmd plndniatl
601 hqssdkfvse lwkdvdr iig ldqvagmset alpgafktrk gmfrtvvggly keqlaklmat
661 lrntnfnfv r ciipnehkka gkldphlvld qlrcngvleg iricrqqfnp rvvfqefrqr
721 yeiltpsnip kgfmdgkqac vlmikaleld snlyrigqsk vffragvlah leeerdkit
781 dviigfqacc rgyllarkafa krqqqltamk vlqrncaayl klrnwqwwrl ftkvkpllv
841 srqeeemmak eeelvkvrek qlaaenrlte metlqsqqlma eklqlqeqlq aetelcaeee
901 elrarltakk qeleeichdl earveeeeeer cqhlqaekkk mqqniqeleee qleeeesarq
961 klqlekvtte akkkleeeq iiledqnckl akekklledr iaefntnlte eeekskslak
1021 lknkheamit dleerlrree kqrqelektr rklegdstdl sdqiaelqaq iaelkmlak
1081 keelqaala rveeeaaqkn malkkirele sqiselqedl eserasrnka ekqkrdlgee
1141 lealkteled tldstaaqqe lrskregevn ilkktleeeea ktheaqiqem rqkhsqavee
1201 laeqlegtkr vkanlekakq tlenergela nevkvlqgk gdsehkrkkv eaqlqelqvk
1261 fnegervrte ladkvtklqv eldnvtglls qdsksksklt kdfsalesql qdtqellqee
1321 nrqklslstk lkqvedekns freqleeeee akhnlekqia tlhaqvadm kkmmedsvgcl
1381 etaeevkrkl qkdleglsqr heekvaaydk lektktrlqq elddllvld hqrqsacnle
1441 kkqkkfdqll aeektisaky aerdraeae areketkals laraleeame qkaelerlnk
1501 qfrtemedlm sskddvgksv helekskral eqqveemktq leeledelqa tedaklrlev
1561 nlqamkaqfe rdlqgrdeqs eekkkqlvrq vremaaeled erkqrsmava arkklemdlk
1621 dleahidsan knrdeaikql rklqagmkdc mrelddtras reeilagake nekkklsmea
1681 emiqlqeela aaerakrqaq qerdeladei anssgkgala leekrrlear iaqleeelee
1741 eggntelind rlkkanlqid qintdlnlr shaqknenar qqlerqnkel kvklqemegt
1801 vkskykasit aleakiaql eqlndnetker qaackqvrrt ekklkdvllq vdderrnaeq
1861 ykdqadkast rklqlkrqle eaeaaqran asrrklqrel edatetadam nrevsslknk
1921 lrrgdldpfvv prrmarkgag dgsdeevdkg adgaeakpae (SEQ ID NO: 50)

```

FIGURA 13

(A)

1 gtctttctctg ggagatgggc gcgcaaaccg accagtgggt ctggggggcgg cagtgatggg
 61 cgtggagatg gcccaatgag ggtgggagtg ggtggggcag gcgcgagcag cagtgctaaa
 121 ggagcccggc ggaggcagcg gtgggtttgg aattgagacg ctggatctgt ggtcgctgct
 181 ggggacgtgt gccggcgcca ccatcttcgg ctgaagaggg aattactttt gggctccttct
 241 gttttacaatg gcccaagaaa ctggactgga ggatcccag aggtatctct ttgtggacag
 301 ggctgtcatc taaaacctg ccaactcaagc tgactggaca gctaaaaagc tgggtgtggat
 361 tccatcggaa cgccatgggt ttgaggcagc tagtattaaa gaagagcggg gcgatgaggt
 421 tatggtggag ctggcagaga atgggaagaa agcaatggtc acaaaagatg acattcagaa
 4301 agaaagagaa agagacttaa aaatcactga taltcatc tttttcCaag ctgcatgCag
 2641 aggctacctc gcccgaaagg cctttgccaa gaaacagcaa caactaagtg ccttaaaggt
 2701 ctgcagcgg aactgtgcgg cgtacctgaa gctgcgacac tggcagtggg ggcgtgtctt
 2761 cacgaagggtg aagcctctcc tccaagtgac ccgccaggag gaagaactcc aggcaaaaga
 2821 tgaggagctg ctgaagggtga aagagaagca gacaaaagtg gaaggggagc ttgaggagat
 2881 ggagcgggaag caccagcagc tgctggaaga gaagaatc ctggcagaac aactgcaagc
 2941 cgagaccgag ctcttcgctg aagcagaaga gatgagagca aggcttgctg ccaaaaagca
 3001 ggaactggag gagatctccc atgacctcga gtccagggtg gaggaggagg aagagcggaa
 3061 ccagatccta cagaa tgaga agaagaagat gcaggcgac attcaggacc tagaagaaca
 3121 actggatgag gagga gggggg cccggcaaaa gctgcagctg gagaaggtga cagcagagggc

3181 taaaat caag aagatggaag aggaggttct gcttctcga gaccagaatt ccaaatttat
3241 caaaga aaag aaactcatgg aagaccgaat tgctgagtgt tcctctcagc tggctgaaga
3301 ggaaga aaag gcaaaaaact tggccaaaat caggaataag caagaagtga tgatctcggg
3361 cttaga agaa cgcttgaaga aggaggagaa aactcgacag gaactggaaa aggccaaacg
3421 gaagct ggat ggggaaacaa ccgatctgca ggaccagatc gctgagctgc aggcacaggt
3481 cgatgagctc aaagtccagt tgaccaagaa ggaggaggag cttcaggggg cgctggccag
3541 aggaga tgat gagacactgc acaagaataa tgcacttaaa gttgcacggg agctgcaggg
3601 ccaaat cgca gagctccagg aagactttga gtctgaaaag gcttcaagga acaaggctga
3661 gaaaca aaaa cgggacttga gtgaggagct ggaagctctg aagacagagc tggaggacac
3721 cctaga cacc acagcagctc agcaggaact ccgcacaaaa cgtgagcagg aagtggcaga
3781 gctgaa gaag gctcttgagg atgaaactaa gaaccacgaa gctcagatcc aggacatgag
3841 acagaggcat gccacagcgc tggaggagct ttccgagcag ctggagcaag cgaaaaggtt
3901 caaagc caac ctggagaaga acaaacaggg cctggagaca gacaacaagg agctggcgtg
3961 tgaggt gaag gtgctgcagc aggtgaaggg ggagtcagag cacaagagga agaagctgga
4021 tgccca ggct caggagctcc atgccaaagg gtccagagggt gtcagagggt gacaggctca gggtagagct
4081 ggccga gaaa gcaacaagc tacagaatga gctggataat gtgtcaaccc tgctggaaga
4141 agctgaga ag aaaggtatta agtttgcgaa ggatgcagct ggtctcagat ctcaactaca
4201 ggacac acag gagctccttc aggaagagac acggcagaaa ctgaacctga gcagtccgat
4261 ccggcagctg gaggaggaga agaacagcct tcaggagcag caggaggagg aggaggaggc
4321 caggaa gaac ctggagaagc aggtgttggc tctgcagctc cagctggctg acaccaagaa
4381 gaaagt ggac gatgacctgg ggacaatcga gagtttggag gaagccaaaa agaaactgct
4441 caagga tgtg gaggcgctga gccagcggct ggaggagaag gtcctggcgt atgacaagct
4501 ggagaagacc aagaaccggc tgcaacaaga actggatgac ctgacgggtg acctggacca
4561 ccagcgcagc atcgtctcca acttggagaa gaaacagaag aagtctgacc agctgttggc
4621 agaaga aaag ggcactctctg ctctctatgc agaagagcgg gaccgggctg gactgaggc
4681 cagaga gaaa gaaaccaag cgtctctcct gcgcggggcc cttgaggagg ccttggaggc
4741 gaaggaggaa ttcgagaggc agaacaagca gcttcgagca gacatggaag acctgatgag
4801 ctctaa agac gatgtgggga agaacgtcca cgagcttgag aatccaagc gagccttggg
4861 gcagcaggtg gaggagatgc ggaccagct ggaggagctg gaggacgagc tgcaggccac
4921 tgagga tgcc aagctccgcc tggaaagtcaa catgcaggcc atgaaggccc agtttgagag
4981 ggacct gcaa acccgagatg agcagaatga agaaaagaag cggctgctgc ttaagcaggt
5041 gcgggagctc gaggcagagc tggaggatga gcggaaacag cgggcaactgg ctgtggcgtc
5101 aaagaa gaag atggagatag acctgaagga cctggaggct cagatcgagg ctgcaacaa
5161 agcccgggat gaagtgatca agcagcttcg caaacttcag gcacagatga aggattacca
5221 gcgtga acta gaagaggctc tagcatctag agatgagatt ttgtctcaat ccaagaaag
5281 tgaaaagaaa ctgaagagtc tgaagcaga aattcttcag ctgcaagagg agtgccctc
5341 atccga ggct gcccgccgac acgcagagca ggagcgagac gagctggctg atgagatgc
5401 caacag cgcc tctggaaagt ctgcgctgtt ggatgagaag cggcgcctgg aagcgcggat
5461 cgcacagctg gaagaggagc tggaggagga gcagagcaac atggagctgc tcaatgaccg
5521 cttccg caag accacgctgc aggtggacac actgaacaca gagctggcag cagagcgcag
5581 cgctgc ccag aagagtgaca atgcccgcc gcagctggag cgacaaaaca aggagctgaa
5641 ggccaagctg caggagctgg agggggcagt caagtccaag tcaaggcta ccatctcagc
5701 cctgga agcc aagattggggc agctggagga gcagcttgag caggaagcca aggagcagc
5761 agctgc caac aaactagctc gtcgaacaga gaagaaactg aaagaaatct tcatgcaggt
5821 tgaaga cgag cgtcggcatg cggatcagta taaggagcag atggagaagg ctaatgccag
5881 gatgaa gcag cttaaaccgac agttggaaga ggctgaggaa gaggccacag gtgccaacgc
5941 atctcggcgt aaactccaaa gggagctgga cgaagccact gggccaatg gggcctgag
6001 ccgcga ggct agcactctca agaaccggct caggcggggc ggtccaatca gctttcttc
6061 aagccg atct ggccggcgc ccagctgcacat tgaggggggca tcgctagagc tgtcagatga
6121 cgacac agaa agtaagacca gtgatgtcaa tgacacacag ccaccccaat cagaataggc
6181 acaggaggtc agaggtgatg ctgaggacag gccagaactc atcccagcag cagtctgctt
6241 gagccctgca ctactgctc gggaaatggca agctcccaga ttctctccag gaaagtcaac
6301 tgtgtcttaa ggctttgcgg cctgcgcaga ctatatcctg cttcagacta gatacaattg
6361 ccccttttta tatatacacc tccacaagac atgcgtatta aacagattgt ctcatcgttg
6421 catctat tttt ccatgtatcc atcaagagac cattttatga cacattaaga agaaaagaacc
6481 tttttgaaac aaactocagg ccctttgttg ccagtggtctg ggccaaaggg ttgccccggg
6541 accgtgctca gctgctctgc atgcctgtc ctactgacag gtaccttagt tctgtgttca

```

6601 tgtggccctg acccttcctt caaccacacc tggctcttta gaacattgtg aacctaacct
6661 gcacttgtgt ctctcatttc ctgtgaatag tgatcactgt ctcagtgagc aaactgggag
6721 aggggctttg gcggttagg ggtgggtttg gattggggaa gcagcatcca ttgggggttc
6781 tcctgcccac ctcccagggt gtgaccctgc ccctcaaatt catggtgtcc ccaccgtctc
6841 aatgtgaata gtctcagagc tctgtgcaca gagaggacag tggccacaac acataagggtg
6901 ccccggttgg cagccatcac agtaacttcc aggtgggtctc ctgagtgctc ggcttgataa
6961 tgccctcaat tcaggagtga gcctctgtga cccttgggggt gctcgcagaa ggctctcca
7021 agcagtcaag ccctcttgca aattcagcca ctgctttgag cccaaaacgg gaatattagt
7081 tttatgtcgg aggtgtgttc caagtttgc aatgaggcta tagcctcaag aagatgccat
7141 ctgcctgaat gttgacatgc cagcgggctg gtgacccttc attttccctt tcccttccct
7201 tggacagtgt tacaatgaac acttagcatt ctgtttttgg ttgatagttg agcaactga
7261 cattacagaa agtgccttag aactacagc actaagacaa tgtaaataat attatttgcc
7321 tctataacaa cttaatgtat taagttctga ctgtgcttca tatcatgtac ctctctagtg
7381 aagtagatgc gcaaacattc agtgacagca aatcagtggt agtgacaagc cccgaccgtg
7441 gcgagtgtct ggaaaacacg gaccttttgg gttaaaagct ttaacatctg tgaggaagaa
7501 ctggtcacat gggtttgtaa tctttgattt cccctgtatg aattgtactg gctgttgacc
7561 accagacacc tgactgcaaa tatcttttct tgtattccca tatttctaga caatgatttt
7621 tgtaagacaa taaatttatt cattatagaa aaaaaaaaaa aaaaaa (SEQ ID NO: 51)

```

(B)

```

1 maqrtgledp erylfdvdrav iynpatqadw takklvwips erhgfeaasi keergdevmv
61 elaengkkam vnkddiqkmn ppkfskvedm aeltclneas vlhnlkdryy sgliytysgl
121 fcvinpykn lpiyseniie myrgkkrhem pphiyaises ayrcmlqdre dqsilctges
181 gagktentkk viqylahvas shkgrkdhni pgelerqllq anpilesfgn aktvknndss
241 rfgkfirinf dvtgyivgan ietylleksr avrqakdert fhifyqllsg agehlksdll
301 legfnnyrfl sngyipipgg qdkdnfqetm eamhimgfsh eeilsmkvv ssvlqfgnis
361 fkkerntdqa smpentvaqk lchllgmnmv eftrailtpr ikvgrdyvqk aqtkeqadfa
421 vealakaty rlfwlvhri nkaldrtkrq gasfigildi agfeifelns feqlcinytn
481 eklqqlfnht mfileqeeyq regiewnfid fgldlqpcid lierpanppg vlalldeecw
541 fpkatdktfv eklvqegqsh skfqkprqlk dkadfciihy agkvdykade wlmknmdpln
601 dnvatllhqs sdrfvaelwk dvdrivgl dq vtgmtetafg saytkkkgmf rtvgglykes
661 ltklmatlrn tnpnfvrcci pnhekrakgl dphlvldqlr cngvlegiri crqgfpnriv
721 fgefrrqyei ltpnaipkgf mdgkqacerm iraleldpnl yriggskiff ragvlahlee
781 erdlkitdii iffqavcrgy larkafakkq qqlsalkvlq rncaayklr hwqwwrvftk
841 vkp11qvtrq eeelqakdee llkvkeqtk vegeleemer khqqlleekn ilaeqlqaet
901 elfaeaeemr arlaakkqel eeilhdlesr veeeeernqi lqnekkkma hiqdleeqld
961 eeegarqklq lekvtaeaki kkmeeevlll edqnskfike kklmedriae cssqlaeeee
1021 kaknlakirn kqevmisdle erlkkeektr qelekakrkl dgettdlqdg iaellqavde
1081 lkvqltkkee elqgalargd detlkhknnal kvarelqazi aelqedfese kasrnkaekq
1141 krdlseelea lkteletdld ttaaqqelrt kregevaek kaledetknh eaqidmrrq
1201 hataleelse qleqakrfka nleknkqgle tdnkelacev kvlqqvkaes ehkrkklda
1261 vqelhakvse gdlrvelae kanklqnel nvstlleeae kkgikfakda aglesqlqdt
1321 qellqeetrq klnlssrirq leeeekslqe qeaeaeark nlekqvlalq sqladtkkkv
1381 dddlgtiesl eeakkkllkd vealsqrlee kvlaydklek tknrlqqeld ditvldhqr
1441 qivsnlekkq kkfdqlaee kgisaryae rdraaeaeare ketkalslar aleaealeake
1501 eferqnkqlr admedlmssk ddvgnvneek ekskraleqq veemrtqlee ledelqated
1561 akrllevnmq amkaqferdl qtrdeqneek krlllkqvre leaelederq qralavaskk
1621 kmeidlkdle aqieaankar devikqlrkl qaqmkygre leearasrde ifaqskesek
1681 klksleaeil qlqeelasse rarrhaequer deladeians asgksallde krrleariaq
1741 leeeleeeqs nmellndrfr ktllqvdtln telaaersaa qksdnarqql erqnkelkak
1801 lqelegavks kfkatisale akigqleeql eqeakeraaa nklvrtekk lkeifmqved
1861 errhadqyke qmekanarmk qlkrqleeae eeatranasr rklqrellda teaneglsre
1921 vstlknrlrr ggpisfsssr sgrrqlhieg aslelsdddt esktsdvndt qppqse
(SEQ ID NO: 52)

```

FIGURA 14

(A)

```

1  actgaggcgc tggatctgtg gtgcgggctg gggacgtgcg cccgcgccac catcttcggc
61  tgaagaggca attgcttttg gatcgttcca tttacaatgg cgcagagaac tggactcgag
121 gatccagaga ggtatctctt tgtggacagg gctgtcatct acaacctcgc cactcaagct
181 gattggacag ctaaaaagct agtgtggatt ccatcagaac gccatggttt tgaggcagct
241 agtatcaaag aagaacgggg agatgaagtt atgggtggagt tggcagagaa tggaaagaaa
301 gcaatggcca acaaagatga tattcagaag atgaaccac ctaagttttc caaggctggag
361 gatatggcag aattgacatg cttgaatgaa gcttccgttt tacataatct gaaggatcgc
421 tactattcag gactaatcta tacttattct ggactcttct gtgtagttat aaacccttac
481 aagaatcttc caatttactc tgagaatatt attgaaatgt acagagggaa gaagcgtcat
541 gagatgcctc cacacatcta tgctatctct gaatctgctt acagatgcat gcttcaagat
601 cgtgaggacc agtcaattct ttgcacgggt gagtcagggt ctgggaagac agaaaataca
661 aagaaagtta ttcagtacct tgcccatggt gcttcttcac ataaaggaag aaaggaccat
721 aatattcctg gggaaacttga acggcagctt ttgcaagcaa atccaattct ggaatcattt
781 ggaaatgcga agactgtgaa aatgataaac tcatctcgtt ttggcaaatt tatteggate
841 aactttgatg taactggcta tatcgttggg gccaacattg aaacatacct tctggaaaag
901 tctcgtgctg ttcgtcaagc aaaagatgaa cgtacttttc atatctttta ccagttgtta
961 tctggagcag gagaacacct aaagtatgat ttgcttcttg aaggatttaa taactaaggc
1 021 tttctctcca atggctatat tcctattccg ggacagcaag acaaagataa tttccaggag
1 081 accatggaag caatgcacat aatgggcttc tcccatgaag agattctgtc aatgcttaaa
1 141 gtagtatctt cagtgtctaca gtttggaat atttctttca aaaaggagag aaatactgat
1 201 caagcttcca tgccagaaaa tacagttgcy cagaagctct gccatctctc tgggatgaat
1 261 gtgatggagt ttactcgggc catcctgact ccccgatca aggtcggccg agactatgtg
1 321 caaaaagccc agaccaaaga acaggcagat ttgacagtag aagcattggc aaaagctacc
1 381 tatgagcggc tcttctgctg gctcgttcat cgcatacaata aagctctgga taggaccaa
1 441 cgtcagggag catctttcat tggaaatcctg gatattgctg gatttgaat ttttgagctg
1 501 aactcctttg aacaactttg catcaactac accaatgaga agctgcagca gctgttcaac
1 561 cacaccatgt ttatcctaga acaagaggaa taccagcgcg aaggcatcga gtggaacttc
1 621 atcgatttgc ggctggatct gcagccatgc atcgacctaa tagagagacc tgcgaacctc
1 681 cctgggtgatc tggccctttt ggatgaagaa tgctggttcc ctaaagccac agataaaacc
1 741 tttggtgaaa aactggttca agagcaaggt tcccactcca agtttcagaa acctcgacaa
1 801 ttaaaagaca aagctgattt ttgcattata cattatgcag ggaaggtgga ctataaggca
1 861 gatgagtggc tgatgaagaa tatggacccc ctgaatgaca acgtggccac ccttttgac
1 921 cagtcacag acagatttgt ggcagagctt tggaaagatg tggaccgat cgtgggtctg
1 981 gatcaagtca ctggtatgac tgagacagct tttggtccg catataaaac caagaagggc
2 041 atgtttcgta ccgttgggca actctacaaa gaatctctca ccaagctgat ggcaactctc
2 101 cgaaacacca accctaactt tgttcgttgt atcattccaa atcacgagaa gagggtctga
2 161 aaattggatc cacacctagt cctagatcag cttcgtctgta atggtgtctc ggaagggatc
2 221 cgaatctgtc gccagggctt ccctaaccga atagttttcc aggaattcag acagagatat
2 281 gagatcctaa ctccaaatgc tattcctaaa ggttttatgg atggtaaaca ggctgtgaa
2 341 cgaatgatcc gggctttaga attggacca aacttgtaaa gaattggaca gagcaagata
2 401 tttttcagag ctggagttct ggcacactta gaggaagaaa gagatttaaa aatcaccgat
2 461 atcattatct tcttccagggc cgtttgcaaa ggttacctgg ccagaaaggg ctttgccaag
2 521 aagcagcagc aactaagtgc cttaaaggtc ttgcagcggg actgtgccgc gtacctgaaa
2 581 ttacggcact ggcagtggtg gcyagtcctc acaaaggtga agccgcttct acaagtgact
2 641 cgccaggagg aagaacttca ggccaaagat gaagagctgt tgaaggtgaa ggagaagcag
2 701 acgaaggtgg aaggagagct ggaggagatg gagcggaaagc accagcagct tttagaagag
2 761 aagaatatcc ttgcagaaca actacaagca gagactgagc tctttgctga agcagaagag
2 821 atgagggcaa gacttgctgc taaaaagcag gaattagaag agattctaca tgacttggag
2 881 tctagggttg aagaagaaga agaaagaaac caaatcctcc aaaatgaaaa gaaaaaatg
2 941 caagcacata ttcaggacct ggaagaacag ctagacgagg aggaaggggc tggcaaaag
3 001 ctgcagctgg aaaaggtgac agcagagggc aagatcaaga agatggaaga ggagattctg
3 061 cttctcgagg accaaaatcc caagttcatc aaagaaaaga aactcatgga agatcgcatt
3 121 gctgagtggt cctctcagct ggctgaagag gaagaaaagg cgaaaaactt ggccaaaatc

```

3181 aggaataagc aagaagtgat gatctcagat ttagaagaac gcttaaagaa ggaagaaaag
3241 actcgtcagg aactggaaaa ggccaaaaga aaactcgacg gggagacgac cgacctgcag
3301 gaccagatcg cagagctgca ggcgcagatt gatgagctca agctgcagct ggccaagaag
3361 gaggaggagc tgcaggggcg actggccaga ggtgatgatg aaacactcca taagaacaat
3421 gcccttaaag ttgtgcgaga gctacaagcc caaattgctg aacttcagga agactttgaa
3481 tccgagaagc cttcacggaa caaggccgaa aagcagaaaa gggacttgag tgaggaactg
3541 gaagctctga aaacagagct ggaggacacg ctggacacca cggcagccca gcaggaacta
3601 cgtacaaaac gtgaacaaga agtggcagag ctgaagaaag ctcttgagga ggaaactaag
3661 aaccatgaag ctcaaatacca ggacatgaga caaagacacg caacagccct ggaggagctc
3721 tcagagcagc tggaaacaggc caagcgggtt aaagcaaatc tagagaagaa caagcagggc
3781 ctggagacag ataacaagga gctggcgtgt gagggtgaagg tcctgcagca ggtcaaggct
3841 gagtctgagc acaagaggaa gaagctcgac gcgcaggtcc aggagctcca tgccaaggct
3901 tctgaaggcg acaggctcag ggtggagctg gcggagaaag caagtaagct gcagatgag
3961 ctagataatg tctccaccct tctggaagaa gcagagaaga aggtattaa atttgctaa
4021 gatgcagcta gtcttgagtc tcaactacag gatacacagg agcttctca gggagagaca
4081 cgccagaaac taaacctgag cagtccgata cggcagctgg aagaggagaa gaacagtctt
4141 caggagcagc aggaggagga ggaggaggcc aggaagaacc tggagaagca agtgctggcc
4201 ctgcagctcc agttggctga taccagaag aaagtagatg acgacctggg aacaattgaa
4261 agtctggaag aagccaagaa gaagcttctg aaggacgcgg aggcctgag ccagcgctg
4321 gaggagaagg cactggcgta tgacaaaactg gagaagacca agaaccgcct gcagcaggag
4381 ctggacgacc tcacgggtga cctggaccac cagcgcagg gcgcctcca cttggagaag
4441 aagcagaaga agtttgacca agtcttagca gaagagaaga gcatctctgc tccgtatgcc
4501 gaagagcggg accgggcccga agccgaggcc agagagaaag aaaccaagc cctgtcactg
4561 gcccgggccc tcgaggaagc cctggaggcc aaggaggagt ttgagaggca gaacaagcag
4621 ctccgagcag acatggaaga cctcatgagc tccaaagatg atgtgggaaa aaacggtcac
4681 gaacttgaaa aatccaaacg ggccttagag cagcaggtgg aggaaatgag gaaccagctg
4741 gaggagctgg aagacgaact ccaggccacg gaagatgcca agcttcgtct ggaggccaac
4801 atgcaggcca tgaaggcgca gttcagagaga gacctgcaaa ccagggatga gcagaatgaa
4861 gagaagaagc ggctgctgat caaacaggtg cgggagctcg aggcggagct ggaggatgag
4921 aggaacacag gggcgcttgc tgtagcttca aagaaaaaga tggagataga cctgaaggac
4981 ctggaagccc aaatcgaggc tgcgaaacaa gctcgggatg aggtgattaa cgcactccgc
5041 aagctccagg ctccagatgaa ggattaccaa cgtgaattag aagaagctcg tgcactcaga
5101 gatgagattt ttgctcaate caaagagagt gaaaagaaat tgaagagtct ggaagcagaa
5161 atccttcaat tgcaggagga acttgccctca tctgagcag cccgccgaca cgcgctgctg
5221 gagagagatg agctggcgga cgagatcacc aacagcgct ctggcaagtc cgcgctgctg
5281 gatgagaagc ggcgtctgga agctcggatc gcacagctgg aggaggagct ggaagaggag
5341 cagagcaaca tggagctgct caacgaccgc ttccgcaaga ccaactctaca ggtggacaca
5401 ctgaacgcog agctagcagc cgagcgcagc gccgccaga agagtgacaa tgcacgccag
5461 caactggagc ggcagaacaa ggagctgaag gccaaagctg aggaactcga ggggtgctgtc
5521 aagtctaagt tcaaggccac catctcagcc ctggaggcca agattgggca tctggaggag
5581 cagcttgagc aggaagccaa ggaacgagca gccccaaca aattagtcog tgcactgag
5641 aagaagctga aagaaatctt catgcaggtt gaggatgagc gtcgacacgc ggaccagtat
5701 aaagagcaga tggagaaggc caacgctcgg atgaagcagc ttaaacgcca gctggaggaa
5761 gcagaagaag aagcgacgcg tgccaacgca tctcggcgta aactccagcg ggaactggat
5821 gatgccaccg aggcacaacga gggcctgagc cgcgaggtca gcacctgaa gaaccggctg
5881 aggcgggggtg gccccatcag cttctcttcc agccgatctg gccggcgcca gctgcacctt
5941 gaaggagctt ccttgagct ctccgacgat gacacagaaa gtaagaccag tgatgtcaac
6001 gagacgcagc caccaccgct agagtaaagt tgcaggaagc cagaggaggc aatacagtg
6061 gacagttagg aatgcaccgc gggcctcctg cagatttcgg agatttcgg gctacgggat
6121 tccttctgga aagatcaact gtgtcttaag gctctccagc ctatgcatac tgtatcctgc
6181 ttcagactta ggtacaattg ctccccctt tatatataga cacacacagg acacatatat
6241 taaacagatt gtttcatcat tgcattctatt ttccatatag tcatcaagag accattttat
6301 aaaacatggt aagacccttt ttaaaacaaa ctccaggccc ttgggttgcgg gtcgctgggt
6361 tattggggca gcgcccgtgt cgtcactcag tcgctctgca tgctctctgt catacagaca
6421 ggtaacctag ttctgtgttc acgtggcccc cgactcctca gccacatcaa gtctcctaga
6481 ccaactgtgga ctctaaactg caettgtctc tctcatttcc ttcaataat gatcaatgct
6541 atttcagtga gcaaaactgt aaaggggctt tggaaagagt aggggggggt ggctggatcg

```

6601 gaagcaacac ccatttgggg ttaccatgtc catcccccaa gggggggcct gccctcgag
6661 tcgatgggtg cccgcatcta ctcatgtgaa ctggccttgg cgagggctgg tctgtgcata
6721 gaagggatag tggccacact gcagctgagg ccccaggtgg cagccatgga tcatgtagac
6781 ttccagatgg tctcccgaac gccttggttc tgccggcgcc ctctcacgt caggagcaag
6841 cagccgtgga ccctaagcc gagctggtgg aaggcccttc cctgtcgca gccgggcctt
6901 catgctgacc ttgcaaattc agccgctgct ttgagcccaa aatgggaata ttggttttgt
6961 gtccgaggct tgttccaagt ttgtcaatga ggtttatgga gctccagaa catagtcct
7021 cttcctgaat gttgacatgc cagtgggtgt gactccttca ttttctcttccccttccct
7081 ttggacagtg ttacagtgaa cacttagcat cctgtttttg gttggtagt aagcaactg
7141 acattacgga aagtgcctta gacactacag tactaagaca atgttgaata tatcattcgc
7201 ctctataaca atttaatgta ttcaagtttg actgtgcttc ataatatgta cctctctagt
7261 caaagtggta ttacagacat tcagtgacaa tgaatcagtg ttaattctaa atccttgatc
7321 ctctgcaatg tgcttgaaaa cacaaacctt ttgggttaaa agctttaaca tctattagga
7381 agaatttgtc ctgtgggttt ggaatcttgg attttcccc tttatgaact gtactggctg
7441 ttgaccacca gacacctgac cgcaaatatc ttttcttcta tccccatatt tctagacaat
7501 gatttttcta agacaataaa tttattcatt atagatattt gcgcctgctc tgtttacttg
7561 aagaaaaaag caccctgtaga gaataaagag acctcaataa acaagaataa tcatgtgaa
(SEQ ID NO: 53)

```

(B)

```

1 maqrtgledp erylfvdrav iynpatqadw takklvwips erhgfeaasi keergdevmv
61 elaengkkam vnkddiqkmn ppkfskvedm aeltclneas vlhnlkdryy sgliytysgl
121 fcvvinpykn lpiyseniie myrgkkrhem pphiyaises ayrcmlqdre dqsilctges
181 gagktentkk viqylahvas shkgrkdhni pgelerqlq anpilesfgn aktvkndnss
241 rfgkfirinf dvtgyivgan ietylleksr avrqakdert fhifyqlqsg agehlksdll
301 legfnnyrfl sngyipipgq qdkdnfgetm eamhimgfsh eeilsmlkvv ssvlqfgnis
361 fkkerntdqa smpentvaqk lchllgmnmv eftrailtpr ikvgrdyvqk aqtekeqadfa
421 vealakaty rlfvrvlhri nkaldrtkrq gasfigildi agfeifelns feqlcinytn
481 eklqqflnht mfileqeeyq regiewnfid fgldlqpcid lierpanppg vlalldecw
541 fpkatdktfv eklvqeggsh skfgkprqlk dkadfciihy agkvdykade wlmknmdpln
601 dnvatllhqs sdrfvaelwk dvdrtvldg vtgmtetafg saykttkgmf rtvgglykes
661 ltklmatlrn tnpnfvrcci pnhekrakgl dphlvldqlr cngvlegiri crqgfpnriv
721 fgefrrryei ltpnaipkgf mdgkqacerm iraleldpnl yrigqskiff ragviahlee
781 erdlkitdii iffqavcrqy larkafakkq qqlsalkvlq rncaaylklr hwqwwrvftk
841 vkpllvtrq eeelqakdee llkvkekqtk vegeleemer khqqlleekn ilaeqlqat
901 elfaeaeemr arlaakkqel eeilhdlesr veeeeernqi lqnekkkma hiqdleeqld
961 eeegarqklq lekvtaeaki kkmeeeiill edqnskfike kklmedriae cssqlaeeee
1021 kaknlakirn kqevmisdle erlkkeektr qelekakrkl dgettdlqdg iaelqaqide
1081 lklqlakkee elqgalargd detlhknnal kvvrelqai aelqedfese kasrnkaekq
1141 krdlseelea lkteletdld ttaaqqelrt kregevaek kaleeetknh eaqiqdmrqr
1201 hataleelse qlegakrfka nleknqgle tdnkelacev kvlqqvkaes ehkrkklda
1261 vqelhakvse gdrlrvlae kasklqneld nvstlleeae kkgikfakda aslesqlqdt
1321 qellqettrq klnlssrirq leeknslqe qeaeaeeark nlekqvlalq sqladtckkv
1381 dddlgtiesl eeakkllkd aealsqrlee kalaydklek tknrlqqeld dltvldhqr
1441 qvasnlekkq kkfdqllaee ksisaryae rdraaeare ketkalslar alealeake
1501 eferqnkqlr admedlmssk ddvgknvhel ekskraleqq veemrtqlee ledelqated
1561 akrlrevnmq amkaqferdl qtrdeqneek krllikqvre leaelederq qralavaskk
1621 kmeidlkdle aqieaankar devikqlrkl qaqmkyqre leearasrde ifaqskesek
1681 klksleaeil qlqeelasse rarrhaequer deladeitns asgksalld krrleariaq
1741 leeeleeeqs nmellndrfr ktllqvdtln aelaersaa qksdnarqql erqnkelkak
1801 lqelegavks kfkatisale akigqleeql eqeakeraaa nklvrrtekk lkeifmqved
1861 errhadqyke qmekanarmk qlkrqleeae eeatranasr rklqrellda teaneglsre
1921 vstlknrlrr ggpisfsssr sgrrqlhleg aslelsddd esktsdvnet qppqse
(SEQ ID NO: 54)

```

FIGURA 15

(A)

```

1 ccttttctgt ccaggccgag gcctctggac cgccctgggc gccgaccatg gctgcagtga
61 ccattgtccgt gtctgggagg aaggtagcct ccaggccagg cccgggtgect gaggcagccc
121 aatcgttccct ctacgcgccc cggacgcca atgtaggtgg ccctggaggg ccacaggtgg
181 agtggacagc ccggcgcctg gtgtgggtgc cctcgggaact gcatgggttc gaggcagcag
241 ccctgcggga tgaaggggag gaggaggcag aagtggagct ggccggagagt gggcgcggcc
301 tgcggctgcc cagggaccag atccagcgca tgaaccacc caagttcagc aaggcagaag
361 atatggctga gctcacctgc ctcaacgagg cctcggctct gcacaacctg cgagaacgct
421 actactccgg gctcatttat acctactctg cccttttctg tctggtcatt aaccatata
2561 ctgctatcct caagctcagg aactggcagt ggtggaggct gttcatcaag gtgaagcccc
2641 tgctgcaggt gacacggcag gatgaggtgc tgcaggcgcg cgcccaggag ctgcagaaag
2701 ttcaggagct gcagcagcag agcgctcgtg aagtggggga actgcagggc cgagtggcac
2761 agctagagga ggagcgcacg cgccctggctg agcagcttcg agcagaagcc gagctctgct
2821 ctgaggccga ggagacgcgg gcgcgactgg ctgcccgaa gcaggagctg gagctggtgg
2881 tgacagagct ggaggcacga gtgggcgagg aagaagagtg cagccggcag ctgcagagtg
2941 agaagaagag gctgcagcag catatccagg agctagagag ccacctgaa gctgaggagg
3001 gtgcccggca gaagctacag ctggagaagg tgaccacaga ggccaagatg aagaaatttg
3061 aggaggacct gctgctcctg gaggaccaga attccaagct gagcaaggag cggaggctgc
3121 tggaggagcg gctggctgag ttctcctcac aggcagcaga agaggaagag aaagtcaaaa

```

3181 gtctcaacaa gctgaggctc aaatatgaag ccacaatctc agacatggaa gaccggctga
3241 agaaggagga gaagggacgc caggaactag agaagctgaa gcgacggctg gacggggaga
3301 gctcagagct tcaggagcag atggtggagc agaagcagag ggcagaggaa ctgctcgcac
3361 agctgggccc caaggaggat gagctgcagg ccgccctgct cagggcagag gaagaggggtg
3421 gtgcccgtgc ccagttgctc aagtccctgc gagaggcaca ggctggcctt gctgaggctc
3481 aggaggacct ggaagctgag cgggtagcca gggccaaggc ggagaagcag cgccgggacc
3541 tgggcgagga gttggaggcc ctacgtgggg agctcgagga cactctggat tccaccaacg
3601 cccagcagga gctgcggtcc aagagggagc aggaggtgac agagctgaa aaagcattgg
3661 aagaggagtc ccgtgcccac gaggtgtcca tgcaggagct gagacagagg catagccagg
3721 cactgggtga gatggccgag cagtggagc aagcccggag gggcaaaggt gtgtgggaga
3781 agactcggct atccctggag gctgaggtgt ccgagctgaa ggccgagctg agcagcctgc
3841 agacctcgag acaggagggg gagcagaaga ggcgccgctt ggagtcccag ctacaggagg
3901 tccagggccc atccagtgat tccgagcggg ctccgtctga ggctgctgag aagctgcaga
3961 gagcccaggc ggaacttgag agcgtgtcca cagccctgag tgaggcggag tccaaagcca
4021 tcaggctggg caaggagctg agcagtgacg agtcccagct gcatgacacc caggaactgc
4081 ttcaggagga gaccagggca aagctggcct tggggtcccg tgtgctgccc cttagaggccg
4141 aggcggcggg gcttcgggag cagatggaag aggaggtggg tgccagggaa cgggctggcc
4201 gggagctgca gagcacgcag gccagctctc ctgaatggcg gcgccgccag gaagaagagg
4261 ctgcccgtgct ggaggctggg gaggaggctc ggcgccgtgc agcccgggag gcagagacc
4321 tgaccacagc cctggcagaa aagactgagg ctgtagaacg actggagcga gcccgccgcc
4381 gactgcagca ggagttggac gatgccactg tggatctggg gcagcagaag cagctcctga
4441 gcacactgga gaagaagcag cggaaatttg accagctcct ggcagaggag aaggctgcag
4501 ttctacgggc tgtggaagac cgtgaacgga tagaggccga aggccgggag cgagaggccc
4561 gggccctgtc gctgaccggg gccctggaag aggagcagga ggcccgggag gagctggaga
4621 ggcagaaccc tgctctgagg gctgagctgg aagcactgct gagcagcaag gatgacgtgg
4681 gcaagaacgt gcacgagctg gagcagccc gtaaggcggc tgaacaggca gccagtgacc
4741 tgcggacaca ggtgacagaa ttggaggatg agctgacagc gcagaggat gccaaagtgc
4801 gcctggaggt gactgtgcag gctctgaagg ctcaacatga acgcgacctg ccaagcccg
4861 atgatgccgg tgaggagagg cggaggcagc tggccaagca gctaagagac gcagaggtag
4921 agcgcgatga ggaacggaag cagagggcac tggctatggc tgcccgcaag aagctggagc
4981 tggaaactgga ggagtgaag gcgcagacat ctgctgctgg gcagggcaag gaagaggcag
5041 tgaagcagct gaagaagatg caggtccaga tgaaggagct gtggcgggag gttagaggaga
5101 cgcgtagctc ccgcgacgag atgtttacc tgagcagggg aatgagaag aagctcaagg
5161 ggctggaagc tgagggtgctc cgtctgcaag aggaacttgc tgcctcagac cgagcccgga
5221 ggcaggccca gcaagacaga gacgagatgg cagaggaggg gccagtgggc aatcttagca
5281 aggcagccac cctggaggaa aaacggcagc tggagggggcg actgagccag ttggaagagg
5341 agctggagga agaacagaa aactcggagc tgctcaagga ccattaccga aagctagtgc
5401 tacaggctga gtccctcacc acagaactgt ctgccgaacg aagtttctca gccaaaggccg
5461 agagtggacg gcagcagctg gagcggcaga tccaggaact gcgggcccgc ttgggtgaag
5521 aggatgctgg agcccgagcc aggcagaaaa tgctgatcgc tgctctggag tctaaactgg
5581 cccaggcaga ggagcagctg gagcagaga gcagggagcg catcctctct ggcaagctgg
5641 tacgcagagc tgagaagcgg ctgaaggagg tagttcttca ggtggatgaa gagcgcaggg
5701 tggctgacca ggtccgggac cagctggaga aaagcaacct ccggctgaag cagctcaaga
5761 ggcagctgga ggaggcagag gaggaggcat ctcgggcaca ggctggtcgg aggcggctgc
5821 agcgggagct ggaggacgtc actgagtctg cagaatccat gaaccgggag gtgaccacgc
5881 tgaggaacag gctccggcgt ggcccactta cattcaccac acggactgtg cgccaggtgt
5941 tccggctgga agagggcgtg gcttctgacg aggaagaggc tgaaggagct gaacctggct
6001 ctgaccaggg ccaggagccg gaggctccgc cccctgccac accccaatga tccagtctgt
6061 cctagatgcc ccaaggacag agccctttcc agtgcccctc ctggtttgca ctttgaaatg
6121 gcaactgtct ctggcacttt ctggcattga tgaaccctcc tgggaccca ggaccctgc
6181 ccaactggggg ccccaaacca aggagctggg tgggagggag gccatgatgg tctctcttgt
6241 tagagaacaa aaattgaacg tggatgtcaa gaatgtcctg tctgcaccta ttttcagcag
6301 gctgtcccc tggagagggc aggcaggggtg cttccatccc ctctcagtat cttgccctct
6361 ttttggggg gaagtggggg gtctgtgtgc tcatagggta atgctcatgg cccctcatgc
6421 tccagacact aaagaaataa aa (SEQ ID NO: 55)

(B)

```

1 maavtmsvsg rkvasrpgpv peaaqsflya prtptnvggpg gpqvewtarr mwwvpselhg
61 feaaaalrdeg eeeaevelae sgrrlrlprd qiqrmnppkf skaedmaelt clneasvlhn
121 lreryysgli ytysglfcv inpykqlpiy teaivemyrg kkrhevpphv yavtegayrs
181 mlqdredqsi lctgesgagk tentkkviqy lahvasspkg rkepgvpasv stmsygeler
241 qllqanpile afgnaktvkn dnsrfgkfi rinfdiagi vganietyll eksrairqak
301 decsfhifyq llggageqlk adlllepcsh yrfltngpss spgqerelfq etleslrvlg
361 llpeeitaml rtvsavlqfg nivlkkernt dqatmpdnta aqklcrlgl gvtdfsral
421 tprikvgrdy vqkaqtkeqa dfalealaka tyerlfrwlv lrlnrldrs prggasflgi
481 ldiagfeifq lnsfeqlcin ytneklqqlf nhtmfvleqe eyqregipwt fldfgldlqp
541 cidlierpan ppglalalde ecwfpkatdk sfvekvaqeq gshpkfqrpr nlrdaqdfsv
601 lhyagkvdyk asewlmknmd plndnvaall hqstdrltae iwkdvegivg leqvsslgdg
661 ppggrprrgm frtvqglyke slsrlmatls ntntpsfvrci vphnekrakg leprlvldql
721 rcngvlegir icrqgfpnri lfqefrqrye iltptnaipkg fmdgkqacek migaleldpn
781 lrvvgqskif fragvlaqle eerdlkvtdi ivsfqaaarg ylarrafqrr qqqqsalrvm
841 qrncaaylkl rnwqwwrlfi kvkpllvqtr rdevlqaraq elqkvqelqg qrsaveirgq
901 grvaqleeer trlaeqbrae aelcseaet tarlaarkqe lelvttelea rvgeeeecsr
961 qlqsekkrlq qhiqueleshl eaeeqarqkl qlekvttteak mkkfeedlll ledqnsklsk
1021 errlleerla efssqaeeee ekvkslnklr lkyeatism edrlkkeekg rqelekklrr
1081 ldgesselqe qmveqkqrae ellaqlgrke delqaallra eeeggaraql kslreagag
1141 laeaqedlea ervarakaek qrrdlgeele alrgeledtl dstnaqqelr skreqevtel
1201 kkaleesra hevsmqelrq rhsqalvema eqleqarrgk gwektrsl eaevselkae
1261 lsslqtsrge geqkrrrles qlqevqgrss dserarseaa eklqraael esvstalsea
1321 eskairlgke lssaesqlhd tqellqestr aklalgsrvr aleaeaaglr eqmeeevvar
1381 eragrelqst qaqlsewrrr qeaaavlea geearraar eaetltqrla ekteaverle
1441 rarrlqqel ddatvdlgqq kqllstlekk qrkfdqllae ekaavlrave drerieaeqr
1501 erearalslt raleeeqear eelerqnrsl raeleallss kddvgknvhe lerarkaaeq
1561 aadlrltqvt eledeltaae daklrlevtv qalkaqherd lqgrddagee rrrqlakqlr
1621 daeverdeer kqralamaar kkleleleel kaqtsaaggg keeavkqlkk mqvqmkelwr
1681 eveetrssrd emftlsrene kklkgleaev lrlqeelaas drarrqaqgd rdemaeevas
1741 gnlskaatle ekrqlegrls qleeeleeeq nnsellkdhy rklvlqvesl ttelsaersf
1801 sakaesgrqq lerqiqelra rlgeedagar arqkmlial esklagaeq leqesreril
1861 sgklvrraek rlkevvlqvd eerrvadqvr dqleksnlrl kqlkrqleea eeasraqag
1921 rrrlqreled vtesaesmnr evttlrnlrl rgplftttrt vrvqvrleeg vasdeeeaeq
1981 aepgsapgge peappatpq (SEQ ID NO: 56)

```

(C)

```

1 ccgaccatgg ctgcagtgac catgtccgtg tctgggagga aggtagcctc caggccaggc
61 ccggtgcctg aggcagccca atcgttcctc tacgcgcccc ggacgccaaa ttaggtggc
121 cctggagggc cacaggtgga gtggacagcc cggcgcatgg tgggggtgcc ctgggaactg
181 catgggttcg aggcagcagc cctgcccggat gaaggggagg aggaggcaga agtggagctg
241 gcggagagtg ggcgcccctt gcggctgccc agggaccaga tccagcgcag gaaccacccc
301 aagttcagca aggcagaaga tatggctgag ctacactgcc tcaacgaggc ctggtctctg
361 cacaacctgc gagaacgcta ctactccggg ctcatattata cctactctgg cctctctctg
421 gtggtcatta acccatacaa gcagctgccc atctacacgg aggccattgt tgaatgtac
481 cggggcaaga agcgccatga ggtgccacct cacgtgtatg ctgtgacgga ggcgctgtac
541 cgcagcatgc ttcaggatcg tgaggatcaa tccattctct gcacgggaga gtctggcgct
601 gggaaagcgg agaacaccaa gaaggtcatc cagtacctgg ccatgtggc atcatctcca
661 aagggcagga aggagcctgg tgtccctggg gagctagagc gtcagcttct tcaagccaac
721 cccatcctag aggcctttgg caatgccaaag acagtgaaga acgacaactc ttcccgattt
781 ggcaaattca tccgcatcaa ctttgatatt gctggctaca tcgtgggagc aaacatcgag
841 acctatctgt tggagaagtc ccgggccatc agacaggcca aggatgaatg cagcttccat
901 atcttctacc agctgctagg gggcgctggg gagcagctaa aagctgacct ccttctggag

```

961 ccctgttccc attatcgctt cctgaccaat gggccctcat cgtccccggg ccaggagcgt
 1021 gagttattcc aggagaccct ggagtccctg cgtgtgctgg gcctcctccc agaagagatc
 1081 actgccatgc tgcgcaactgt ctctgctgtc ctccagtttg gcaacattgt cctgaagaaa
 1141 gagcgcaata cggaccaagc caccatgcct gacaacacag ctgcccagaa gctttgccgc
 1201 ctcttgggac tccgagtgac cgacttctcc agagcccttc tcacaccccg catcaaagtg
 1261 ggccgagatt atgttcagaa agcacaacc aaggagcagg ctgactttgc cctggaggct
 1321 ctggccaaag ctacctatga ggcctgttc cgctggctgg ttctgctggc caaccgtgcc
 1381 ctggacagaa gcccgcggca ggggtgcctcc ttctgggca tcctggacat cgcgggcttt
 1441 gagatcttcc agctgaactc cttcgagcag ctgtgcatca actacaccaa cgagaagcta
 1501 cagcagctat tcaaccacac catgttctgt ctggagcagg aggagtacca gcgagagggc
 1561 atcccctgga ccttcctaga cttcgggttg gacctgcaac cttgcatcga cctcatagag
 1621 cgtccggcca accctccagg tctcctggcc ctgctggacg aggagtgtct gttccccaa
 1681 gccacggaca agtcttttgt ggagaaggtc gcccaggagc agggcagcca ccccaaattc
 1741 cagcgcacca ggaacctgcg agatcaggcc gacttcagcg tcctgacta tgccggcaag
 1801 gttgactaca aagccagtga gtggctgatg aagaacatgg acccactgaa tgacaatgtg
 1861 gccgccttgc ttcaccagag cacggatcgt ctcacagctg agatctgga ggatgtggag
 1921 ggcctcgtgg ggctggagca agtaagcag ctggagatg gccaccggg gccccgcccc
 1981 cgcctgggaa tgttcggac tgtggggcag ctctacaaag aatccctgag cgcctcatg
 2041 gccacgctca gcaacaccaa ccctagtttt gtccgctgca tegtcccaa tcatgagaag
 2101 agggctggaa agctggagcc ggcctgggtg ctggaccaac tccgttgtaa cggggctctc
 2161 gagggatatac gcatctgtcg ccaaggcttc cccaaccgca tcctctcca ggagtccga
 2221 cagcgtatg aaatcctcac cccgaacgct attccaagg gcttcatgga cggcaaacag
 2281 gcctgtgaga agatgatcca ggccctggag ctagacccca acctgtaccg tgtggccaa
 2341 agcaagatct tcttccgggc aggggtcctg gccagctgg agggaggcgg ggacctgaaa
 2401 gtcaccgaca tcatagtgtc tttccaggca gcggcacggg gctacctggc ccgtagggct
 2461 ttccagagac ggcagcagca gcagagtgt ctgagggatg tgcaagaaa ctgtgtgctc
 2521 tacctcaagc tcaggaactg gcagtgtgg aggctgttca tcaaggtgaa gccctgctg
 2581 caggtgacac ggcaggatga ggtgctgcag gcgcgcgcc aggagtgcga gaaagtccag
 2641 gagctgcagc agcagagcgc tcgtgaagtg ggggaactgc agggctcagt ggcacagcta
 2701 gaggaggagc gcacgcgctt ggctgagcag cttcgagcag aagccgagct ctgctctgag
 2761 gccgaggaga cgcgggcccg actggctgcc cggaagcagg agctggagct ggtggtgaca
 2821 gagctggagg cacgagtggg cgaggaagaa gagtgcagcc ggcagctgca gagtgagaag
 2881 aagaggctgc agcagcatat ccaggagcta gagagccacc tggaaagtga ggagggtgcc
 2941 cggcagaagc tacagctgga gaaggtgacc acagaggcca agatgaagaa atttgaggag
 3001 gacctgctgc tcctggagga ccagaattcc aagctgagca aggagcggag gctgctggag
 3061 gagcggctgg ctgagttctc ttcacaggca gcagaagagg aagagaaagt caaaagtctc
 3121 aacaagctga ggctcaaata tgaagccaca atctcagaca tggaaagacc gctgaagaag
 3181 gaggagaagg gacgccagga actagaaag ctgaagcagc ggctggacgg ggagagctca
 3241 gagcttcagg agcagatggt ggagcagaag cagaaggcag aggaaactgct cgcacagctg
 3301 ggccgcaagg aggatgagct gcaggccgcc ctgctcaggg cagaggaaga ggggtggtgcc
 3361 cgtgcccagt tgetcaagtc cctgcgagag gcacaggctg gccttgctga ggctcaggag
 3421 gacctggaag ctgagcgggt agccagggcc aaggcggaga agcagcggc ggacctgggc
 3481 gaggagttgg aggccctacg tggggagctc gaggacactc tggattccac caacgcccag
 3541 caggagctgc ggtccaagag ggagcaggag gtgacagagc tgaagaaagc attggaagag
 3601 gagtcccgtg ccatgaggt gtccatgcag gagctgagac agaggcatag ccaggcactg
 3661 gtggagatga ccgagcagtt ggagcaagcc cggaggggca aaggtgtgtg ggagaagact
 3721 cggctatccc tggaggctga ggtgtccgag ctgaaggccg agctgagcag cctgcagacc
 3781 tcgagacagg agggtagca gaagagcgc cgcctggagt cccagctaca ggaggctccag
 3841 ggccgatcca gtgattcgga ggggctcgg tctgaggctg ctgagaagct gcagagagcc
 3901 caggcggaac ttgagagcgt gtccacagcc ctgagtgagg cggagtccaa agccatcagg
 3961 ctgggcaagg agctgagcag tgcagagtcc cagctgcatg acaccagga actgctcag
 4021 gaggagacca gggcaaagct ggccttgggg tcccgtgtgc gtgccctaga ggccgagggc
 4081 gcggggcttc gggagcagat ggaagaggag gtggttgcca gggaaacggc tggccgggag
 4141 ctgcagagca cgcaggccca gctctctgaa tggcggcgcc gccaggaaga agaggccgcg
 4201 gtgctggagg ctggggagga ggctcggcgc cgtgcagccc gggaggcaga gacctgacc
 4261 cagcgcctgg cagaaaagac tgaggctgta gaacgactgg agcgagcccg gcgcccactg
 4321 cagcaggagt tggacgatgc cactgtggat ctggggcagc agaagcagct cctgagcaca

4381 ctggagaaga agcagcggaa atttgaccag ctccctggcag aggagaaggc tgcagttcta
4441 cgggctgtgg aagaccgtga acggatagag gccgaaggcc gggagcgaga ggccccggcc
4501 ctgtcgctga cccgggcccct ggaagaggag caggaggccc gggaggagct ggagaggcag
4561 aaccgtgctc tgagggctga gctggaagca ctgctgagca gcaaggatga cgtgggcaag
4621 aacgtgcacg agctggagcg agcccgtaag gcggtgaa acggagccag tgacctgcgg
4681 acacaggtga cagaattgga ggatgagctg acagccgcag aggatgcca gctgcgcctg
4741 gaggtgactg tgcaggctct gaaggctcaa catgaacgag acctgcaggg ccgcatgat
4801 gccggtgagg agaggcggag gcagctggcc aagcagctaa gagacgcaga ggtagagcgc
4861 gatgaggaac ggaagcagag ggcactggct atggctgccc gcaagaagct ggagctggaa
4921 ctggaggagt tgaaggcgca gacatctgct gctgggcagg gcaaggaaga ggcagtgaag
4981 cagctgaaga agatgcaggt ccagatgaag gagctgtggc gggaggtaga ggagacgcgt
5041 agctcccgcg acgagatggt taccctgagc agggaaaatg agaagaagct caaggggctg
5101 gaagctgagg tgctgcgtct gcaagaggaa cttgctgcct cagaccgagc ccggaggcag
5161 gcccagcaag acagagacga gatggcagag gagggtggcca gtggcaatct tagcaaggca
5221 gccaccctgg aggaaaaacg gcagctggag gggcgactga gccagttgga agaggagctg
5281 gaggaagaac agaacaactc ggagctgctc aaggaccatt accgaaagct agtgctacag
5341 gtcgagtccc taccacaga actgtctgcc gaacgaagtt tctcagccaa ggccgagagt
5401 ggacggcagc agctggagcg gcagatccag gaactgcccg cccgcttggg tgaagaggat
5461 gctggagccc gagccaggca gaaaatgctg atcgtgctc tggagtctaa actggcccag
5521 gcagaggagc agctggagca ggagagcagg gagcgcatcc tctctggcaa gctggtacgc
5581 agagctgaga agcggctgaa ggaggtagtt cttcaggtgg atgaagagcg cagggtggtc
5641 gaccaggtcc gggaccagct ggagaaaagc aacctccggc tgaagcagct caagaggcag
5701 ctggagaggc cagaggagga ggcactctcg gcacaggctg gtcggaggcg gctgcagcgg
5761 gagctggagg acgtcactga gtctgcagaa tccatgaacc gggaggtgac cacgctgagg
5821 aacaggctcc ggcgtggccc acttacattc accacacgga ctgtgcgcca ggtgttccgg
5881 ctggaagagg gcgtggcttc tgacgaggaa gaggctgaag gagctgaacc tggctctgca
5941 ccaggccagc agccggaggc tccgccccct gccacacccc aatgatccag tctgtcctag
6001 atgccccaaq gacagagccc tttccagtgc ccctcctggt ttgcactttg aaatggcact
6061 gtctctctggc actttctggc attgatgaac cctcctggga ccccaggacc cctgcccact
6121 gggggcccca aaccaaggag ctgggtggga gggaggccat gatggtctct cttgtagag
6181 aacacaaatt gaacgtggat gtcagaatg tctgtctctc acctatcttc agcaggctg
6241 tcccctggag agggcaggca ggggtcttc atcccctctc agtatcttgc cctcttttt
6301 ggggggaagt ggggtgtctg tgtgctcata gggtaatgct catggcccct catgctccag
6361 acactaaaga aataaaa (SEQ ID NO: 57)

(D)

1 maavtmsvsg rkvasrpgpv peaaqsflya prtpnvggpg gpqvwetarr mvwvpselhg
61 feaaalrdeg eeeaevelae sgrrlrlprd qiqrmpkpf skaedmaelt clneasvlhn
121 lrerysqli ytysglfcvv inpyqlpiy teaivemyrg kkrhevpphv yavtegayrs
181 mlqdredqsi lctgesgagk tentkkviqy lahvasspkg rkepgvpgel erqllqanpi
241 leafgnaktv kndnssrfgk firinfdiag yivganiety lleksrairq akdecsfhif
301 yqllggageq lkadlllepc shyrfllngp ssspgqerel fquetleslr lglppeeita
361 mlrtvsavlq fgnivlkker ntdqatmpdn taaqklcrl1 glgvtdfsra lltprkvgr
421 dyvqkaqtke qadfaleala katyerlfrw lvlrlnrald rsprqgasfl gildiagfei
481 fqlnsfeqlc inytneklqq lfnhtmfvle qeeyqregip wtfldfgldl qpcidlierp
541 anppgllall deecwfpkat dksfvekvaq eggshpkfqr prnlrdqadf svlhyagkvd
601 ykasewlmkn mdplndnvaa llhqstdr1t aeiwkdvegi vgleqvssl1g dgppggrpr
661 gmfrtvqqly keslsrmat lsntnpsfvr civpnhekra gkleprlvld qlrcngvleg
721 iricrqqfnp rilfgefrqr yeiltpnaip kgfmdgkqac ekmiqaleld pnlyrvqqsk
781 iffragvlaq leerdlkvt diivsfqaaa rgylarrafaq rrqqqqsalr vmqrncaayl
841 klrnwqwrl fikvkpllv trqdevlqar aqelqkvqel qqsarevge lqgrvaqlee
901 ertrlaeqlr aeaalcseae etrarlaark qe1elvtel earvgeeeec srqlqsekk
961 lqqhigeles hleaegarq klqlekvte akmkkfeedl l1ledqnsk1 skerr1leer
1021 laefssqaae eekvkslnk lrlkyeatis dmedrlkkee kgrqe1ekl1k rrd1gessel

1081 qeqmveqkqr aeellaqlgr kedelqaall raeeggara qlkkslreaq aglaeaqedl
 1141 eaervaraka ekqrrdlgee lealrgeled tldstnaqqe lrskregevt elkkaleees
 1201 rahevsmqel rqrhsqalve maeqlegarr gkgvwektrl sleaevselk aelsslqtsr
 1261 qegeqkrrrl esqlqevqgr ssdserarse aaeklqraqa elesvstals eaeskairlg
 1321 kelssaesql hdtqellqee traklalgsr vraleaeaag lreqmeeevv areragrelq
 1381 stqaqlsewr rrqeeeaavl eageearrra areaetltqr laekteaver lerarrllqq
 1441 elddatvdlg qqkqllstle kkqrkfdqll aeekaavlra vedrerieae grerearals
 1501 ltraleeeqe areelerqnr alraeleall sskddvgknv helerarkaa eqaasdirtq
 1561 vteledelta aedaklrlev tvqalkaqhe rdlqgrddag eerrrqlakq lrdaeverde
 1621 erkqralama arkklelele elkaqtsaag qgkeeavkql kkmqvqmkel wreveetrss
 1681 rdemftlsre nekkkglea evlrlqeela asdrarrraq qdrdemaeev asgnlskaat
 1741 leekrqlegr lsqleeelee eqnnsellkd hyrklvlqve slttelsaer sfsakaesgr
 1801 qqlerqiqel rarlgeedag ararqkmlia alesklaqae eqleqesrer ilsgklvrra
 1861 ekrlkevvlq vdeerrvadq vrdqleksnl rlkqlkrqle eaeeasraq agrrrlqrel
 1921 edvtesaesm nrevttlrnr lrrgplttft rtvrqvfrle egvasdeeea egaepgsapp
 1981 qepeappat pq (SEQ ID NO: 58)

FIGURA 16

(A)

```

1 ctctttctcc ccaggccgaa gcctcgggac ggcoctggaa gccgaccatg gcagccgtga
61 ccatgtcggg gcccgggcgg aaggcgcccc ccaggccggg cccagtgccg gaggcggccc
121 agccgttcct gttcacgccc cgcgggcccc gcgcggtggg cgggctggc tccggcacct
181 ccccgaggt ggagtggacg gcccgcgctc tegtgtgggt gccttcggag ctteacgggt
241 tcgaggcggc ggcgctgcgg gacgaaggcg aggaggaggc ggaggtggag ctggcggaga
301 gcgggaggcg gctgcgactg ccgcgggacc agatccagcg catgaaccgg cccaagttca
361 gcaaggccga ggacatggcc gagctgacct gcctcaacga ggctcgggtc ctgcacaacc
421 tccgggagcg gtactactcc ggectcatct acacgtactc cggccttttc tegtgtgtca
481 tcaaccgta caagcagctt cccatctaca cagaagccat tgtggagatg taccggggca
541 agaagcgcca cgaggtgcca ccccacgtgt acgcagtgac cgagggggcc tatcggagca
601 tgctgcagga tcgtgaggac cagtccattc tctgactgg agagtctgga gctgggaaga
661 cggaaaacac caagaaggtc atccagtacc tcgcccacgt ggcatcgtct ccaaagggca
721 ggaaggagcc ggggtgtccc ggtgagctgg agcggcagct gcttcaggcc aaccccatcc
781 tagaggcctt tggcaatgcc aagacagtga agaatgacaa ctctcccga ttcggcaaat
841 tcatccgcat caactttgat gttgcgggtt acatcgtggg cgccaacatt gagacctacc
901 tgctggagaa gtgcggggcc atccgcccagg ccaaggacga gtgcagcttc cacatcttet
961 accagctgct gggggggcgt ggagagcagc tcaaagccga cctcctcctc gagcctgct
1021 cccactaccg gttcctgacc aacgggcccgt catcctctcc cggccaggag cgggaactct
1081 tccaggagac gctggagtgc ctgcgggtcc tgggattcag ccacgaggaa atcatctcca
1141 tgctgcggat ggtctcagca gttctccagt ttggcaacat tgcttgaag agagaacgga
1201 acaccgatca agccaccatg cctgacaaca cagctgcaca gaagctctgc cgcctcttgg
1261 gactgggggt gacggatttc tcccgagcct tgctcaccct tcgcatcaaa gttggccgag
1321 actatgtgca gaaagcccag actaaggaac aggctgactt cgcgctggag gccctggcca
1381 aggccacctc cgagcgcctc ttccgctggc tggttctgcy cctcaaccgg gccttggacc
1441 gcagcccccg ccaaggcgcc tccttccctg gcacccctga catcggggg tttgagatct
1501 tccagctgaa ctctctcgag cagctctgca tcaactacac caacgagaag ctgcagcagc
1561 tcttcaacca caccatgttc gtgctggagc aggaggagta ccagcgtgag ggcacccct
1621 ggaccttcct cgactttggc ctgcacctgc agccctgat cgacctcatc gagcggccgg
1681 ccaaccccc tggactcctg gccctgctgg atgaggagtg ctggttcccg aaggccacag
1741 acaagtcggt tgtggagaag gtagcccagc agcagggcgg ccaccccaag tccagcggc
1801 cgaggcacct gcgggatcag gccgacttca gtgttctcca ctacgcgggc aaggtcgact
1861 acaaggccaa cgagtggctg atgaaaaaca tggacctctt gaatgacaac gtgcagcct
1921 tgctccacca gagcacagc cggtgacgg cagagatctg gaaagacgtg gagggatcg
1981 tggggctgga acaggtgagc agcctgggcy acggcccacc aggtggccgc cccgctggg
2041 gtatgttccg gacagtggga cagctctaca aggagtccct gagccgctc atggccacac
2101 tcagcaaac caaccccagt tttgtccggt gcattgtccc caaccacgag aagaggccg
2161 ggaagctgga gccacggctg gtgctggacc agcttcgctg caacggggtc ctggagggca
2221 tccgcatctg tcgcccaggc tcccccaacc gcacctctt ccaggagttc cggcagcgat
2281 acgagatcct gacacccaat gccatcccc aaggcttcat ggatgggaag caggcctgtg
2341 aaaagatgat ccaggcgtg gaactggacc ccaacctcta ccgctggga cagagcaaga
2401 tcttcttccg ggctggggtc ctggcccagc tggaaagagga gcgagacctg aaggtcaaccg
2461 acatcatcgt ctcttccag gcagctgccc ggggatacct ggctcgcagg gcctccaga
2521 agcggcagca gcagcagagc gccctgaggg tgatgcagcy gaactgcgcy gcctacctca
2581 agctgagaca ctggcagtgg tggcggtgt ttaccaagg gaagccactg ctgcaggtga
2641 cgcggcagga tgaggtgctg caggcacggg cccaggagct gcagaaagtg caggagctac
2701 agcagcagag cgcggcgaa gttggggagc tccagggccg agtggcacag ctggaagagg
2761 agcgcgccc cctggcagag caattgcgag cagaggcaga actgtgtgca gagggcagg
2821 agacgcgggg gaggctggca gcccgcaagc aggagctgga gctggtggtg tcagagctgg
2881 aggctcgcgt gggcgaggag gaggagtgca gccgtcaaat gcaaaccgag aagaagaggc
2941 tacagcagca catacaggag ctagaggccc accttgaggc tgaggagggt gcgcggcaga
3001 agctgcagct ggagaaggtg acgacagagg caaaaatgaa gaaatttgaa gaggacctgc
3061 tgctcctgga agaccagaat tccaagctga gcaagagcgg aagctgctgg aagatcgtct
3121 ggccgagttc tcatcccagg cagctgagga ggaggagaag gtcaagagcc tcaataagct

```

3181 acggctcaaa tatgaggcca caatcgcaga catggagggga cgcctacgg aaggaggaga
3241 agggctcgcca ggagctggag aagctgaagc ggaggctgga tggggagagc tcagagctgc
3301 aggagcagat ggtggagcag caacagcggg cagaggagct gggggcccag ctggggcggga
3361 aggaggagga gctgcaggct gccctggcca gggcagaaga cgagggtggg gcccgggccc
3421 agctgctgaa atccctgcgg gaggtcaag cagccctggc cgaggcccag gaggacctgg
3481 agtctgagcg tgtggccagg accaagcggg agaagcagc cggggacctg ggcgaggagc
3541 tggaggcgct gcggggcgag ctggaggaca cgctggactc caccaacgca cagcaggagc
3601 tccggctcaa gagggaacag gaggtgacgg agctgaagaa gactctggag gaggagactc
3661 gcatccacga ggcggcagtg caggagctga ggcagcgcca cggccaggcc ctgggggagc
3721 tggcggagca gctggagcag gcccggaggg gcaaaggtgc atgggagaag acccggctgg
3781 ccctggaggc cgaggtgtcc gagctgcggg cagaactgag cagcctgcag actgcacgtc
3841 aggagggtga gcagcggagg cgcgcctgg agttacagct gcaggaggtg cagggccggg
3901 ctggtgatgg ggagagggca cgagcggagg ctgctgagaa gctgcagcga gcccaggctg
3961 aactggagaa tgtgtctggg gcgctgaacg aggtgagtc caaaaccatc cgtcttagca
4021 aggagctgag cagcacagaa gccagctgc acgatgcccc ggagctgctg caggaggaga
4081 ccagggcgaa attggccttg gggccccggg tgcgagccat ggaggctgag gcagccggg
4141 tgcgtgagca gctggaggag gaggcagctg ccagggaacg ggcgggccgt gaactgcaga
4201 ctgcccaggc ccagctttcc gagtggcggc ggcgccagga ggaggaggca ggggactgg
4261 aggcagggga ggaggcacgg cgcggggcag cccgggaggc cgaggccctg acccagcggc
4321 tggcagaaaa gacagagacc gtggatcggc tggagcgggg ccgccggccg ctgcagcagg
4381 agctggacga cgccaccatg gacctggagc agcagcggca gcttgtgagc accctggaga
4441 agaagcagcg caagtttgac cagcttctgg cagaggagaa ggcagctgta ctccgggag
4501 tggaggaaacg tgagcggggc gaggcagagg gccgggagcg tgaggctcgg gccctgtcac
4561 tgacacgggc actggaggag gagcaggagg cacgtgagga gctggagcgg cagaaccggg
4621 ccctgcgggg tgagctggag gcactgtga gcagcaagga tgacgtcggc aagagcgtgc
4681 atgagctgga acgagcctgc cgggtagcag aacaggcagc caatgatctc cgagcacagg
4741 tgacagaact ggaggatgag ctgacagcgg ccgaggatgc caagctgcgt ctggaggtga
4801 ctgtgcaggc tctcaagact cagcatgagc gtgacctgca gggccgtgat gaggctggtg
4861 aagagagggc gaggcagctg gccaaagcagc tgagagatgc agaggtggag cgggatgagg
4921 agcggaaagca gcgcaactctg gccgtggctg cccgcaagaa gctggaggga gagctggagg
4981 agctgaaggc tcagatggcc tctgcccggc agggcaagga ggaggcggtg aagcagcttc
5041 gcaagatgca ggcccagatg aaggagctat ggcgggaggt ggaggagaca cgcacctccc
5101 gggaggagat cttctcccag aatcgggaaa gtgaaaagcg cctcaagggc ctggaggctg
5161 aggtgctgcg gctgcaggag gaactggccc cctcggaccg tgctcggcgg caggcccagc
5221 aggaccggga tgagatggca gatgaggtgg ccaatggtaa ccttagcaag gcagccattc
5281 tggaggagaa gcgtcagctg gagggggcggc tggggcagtt ggaggaaagag ctggagagg
5341 agcagagcaa ctcagagctg ctcaatgacc gctaccgcaa gctgctcctg caggtagagt
5401 cactgaccac agagctgtca gctgagcgc gtttctcagc caaggcagag agcggggcggc
5461 agcagctgga acggcagatc caggagctac ggggacgcct ggggtaggag gatgctgggg
5521 cccgtgcccg ccacaagatg accattgctg cccttgagtc taagtggcc caggctgagg
5581 agcagctaga gcaagagacc agagagcgc tccctctctg aaagctggtg cgcagagctg
5641 agaagcggct taaagaggtg gtgctccagg tggaggagga gcggagggtg gctgaccagc
5701 tccgggacca gctggagaag ggaaaccttc gagtcaagca gctgaagcgg cagctggagg
5761 aggccgagga ggaggcatcc cgggctcagg ctggccgccc gaggctgcag cgtgagctgg
5821 aagatgtcac agagtcggc gagtccatga accgtgaagt gaccacactg aggaaccggc
5881 ttcgacggcg cccctcacc ttcaccacc ccacgggtgcg ccaggtcttc gactagagg
5941 agggcgtggc atccgacgag gaggcagagg aagcacagcc tgggtctggg ccatccccgg
6001 agcctgaggg gtccccacca gcccaccccc agtgacccta ccctgtcccc agatgacta
6061 acagatgggg cccagcccc ttcctccctg gacccacgg gccctgtcc caggaacccc
6121 gccctctgac ttcttgccct ttggaaatgg tgcagcactc tggcatttat cacccccacc
6181 tgggtcccc gcaacctccc atcaaaggat gaccctaaa cacagaggag cggggcaggc
6241 agggaggcaa ggactggagc taccttgctt gttgggggac tgggtacagt tggcaagctg
6301 tgtttccatc agctccctgt cctcctttct tccctcgta ttgatctata gacattagga
6361 agggagtgag accgctcctc caccatcctc agccagtga acccatccct tctgtctctc
6421 tctctctctc tctctctccc tccctcctct tccctaccct ctcaccatct tcttgccctc
6481 ctctgagggg ctctctgtgc atctttttag gaatctcgt ctcactctct acgtagccac
6541 tctccttccc ccattttctgc gtccaccctc gaactcctga gcgacagaag ccccaggcct

6601 ccaccagcct tgaacccttg caaaggggca ggacaagggg acccctctca ctctgctgc
 6661 tgcccatgct ctgccctccc ttctgggtgc tctgaggggt cggagcttcc ctctgggact
 6721 aaaggagtgt cctttaccct cccagcctcc aggctctggc agaaataaac tccaaccgca
 6781 ctggac (SEQ ID NO: 59)

(B)

1 maavtmsvpg rkapprrpgpv peaaqpflft prgpsagggp gsgtspqvew tarrlvwvps
 61 elhgfeaaaal rdegeeeaeve elaesgrrlr lprdqiqrma ppkfskaedm aeltclneas
 121 vlhnlreryy sgliytysgl fcvvinpykq lpiyteaive myrgkkrhev pphvyavteg
 181 ayrsmiqdre dqsilctges gagktentkk viqylahvas spkgrkepgv pgelerqllq
 241 anpileafgn aktvkndnss rfgkfirinf dvagyivgar ietylleksr airqakdecs
 301 fhifyqllgg ageqlkadll lepcshyrfl tngpssspgg erelfqetle sirvlgfshe
 361 eiismrlmvs avlqfgnial krerntdqt mpdntaaqkl crllglgvt d fsralltpri
 421 kvgrdyvqka qtkeqadfal ealakatyer lfrwlvrlra raldrsprgg asflgildia
 481 gfeifqlnsf eqlcinytne klqqflnhtm fvleqeeyqr egipwtfldf gldlqpcidl
 541 ierpanppgl lalldeecwf pkatdksfve kvaqeqgghp kfqrprhlrd qadsvlhya
 601 gkvdykanew lmkndplnd nvaallhqst drltaeiwkd vegivgleqv sslgdgppgg
 661 rprrgmfrtv gqlykeslrs lmatlsntnp sfvrclvphn ekragklepr lvldqlrcng
 721 vlegiricrq gfpnrilfge frqryeiltp naipkgfmdg kqacekmiqa leldpnlyrv
 781 gskifffrag vlagleeerd lkvt diivsf qaaargylar rafqkrqqq salrvmqrn
 841 aaylklrhqw wwrlftkvkq llqvtrqdev lqaraqelqk vqelqqqsar evgelqgrva
 901 qleeararla eqlraaealc aeaetrgrl aarkqelev vselearvge eeecsrqmq
 961 ekkrlqqhiq eleahleae garqklqlek vtteakmkkf eedlllledq nsklksksgc
 1021 wkiwvpsshp rqlrrrrrsr asisygsnmr pqsqtwrdrL rkeekgrqel eklkrldge
 1081 sselqeqmve qqraaelra qlgrkeelq aalaraedeg garaqlksl reaqaalaea
 1141 qedleserva rtkaeqrrd lgeelealq eledtldstn aqqelrskre qevtelkktl
 1201 eeetriheaa vqelqrhgq algelaeqle qarrgkgawe ktrlaleaev selraelssl
 1261 qtargegeqr rrrlelqlqe vqgragdger araeaaklq raqaelenvs galneaeskt
 1321 irlskelsst eaqlhdaqel lqetrakla lgsrvramea eaagltreql eaaaarerag
 1381 relqtaqaql sewrrrgeee agaleageea rraareaea ltqrlaekte tvdrlergrr
 1441 rlqqelddat mdleqqrqlv stlekkqrkf dqlaeekea vlraveerer aaegrerea
 1501 ralsltrale eegeareele rqnralrael eallsskddv gksvhelera crvaeqaand
 1561 lraqvteled eltaaedakl rlevtvqalk tqherdlqgr deageerrr lakqlrdaev
 1621 erdeerqrt lavaarkkle geleelkaqm asagqkeea vkqlrkmqag mkelwrevec
 1681 trtsreeifs qnresekrk gleaevlrlq eelaasdrar rqaqqdrdem adevangnl
 1741 kaaiiekrq legrlgqlee eleeeqsnse llndryrkll lqveslttel saersfsaka
 1801 esgrqqlerq iqelrgrlge edagararhk mtiaaleskl aqaeeqlqle trerilsgkl
 1861 vrraekrlke vvlqveeerr vadqlrdqle kgnlrvkqlk rqlaeaeaea sraqagrrrl
 1921 greledvtes aesmrevtt lnrnlrrgpl tfttrtvrqv frleegvasd eeaeaaqpgs
 1981 gpspepegsp pahpq (SEQ ID NO: 60)