

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 998**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08735066 .6**  
96 Fecha de presentación: **07.04.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2142563**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.01.2010**

54 Título: **HISTONAS BIS-MET.**

30 Prioridad:  
**05.04.2007 EP 07007200**  
**26.09.2007 EP 07018956**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.01.2012**

73 Titular/es:  
**SYMBIOTEC GESELLSCHAFT ZUR FORSCHUNG  
UND ENTWICKLUNG AUF DEM GEBIET DER  
BIOTECHNOLOGIE MBH  
SCIENCE PARK SAAR 1  
66123 SAARBRÜCKEN, DE y  
THIRY, MICHEL**

72 Inventor/es:  
**GROSS, Peter;**  
**JÖRNVALL, Hans;**  
**THIRY, Michel;**  
**FORMICKA-ZEPPEZAUER, Grazyna y**  
**ZEPPEZAUER, Michael**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 372 998 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

Histonas bis-met

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que consiste en dos  
 5 residuos de metionina como primero y segundo aminoácidos en el extremo N unidos a través de un enlace peptídico  
 a una histona eucariota madura. La presente invención se refiere además a un vector que contiene dicha molécula  
 de ácido nucleico, un huésped transformado con dicho vector, a polipéptidos codificados por la molécula de ácido  
 10 nucleico y a composiciones farmacéuticas y diagnósticas. La presente invención también se refiere al uso de la  
 molécula de ácido nucleico, vectores, huéspedes y el polipéptido de la invención para la preparación de una  
 composición para el tratamiento de enfermedades. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento de  
 analizar la presencia de la molécula de ácido nucleico o del polipéptido en una muestra y a un kit.

A lo largo de la presente memoria descriptiva se citan diversos documentos. El contenido de la divulgación de dichos  
 15 documentos, incluidos los manuales del fabricante, se incorpora en el presente documento en su totalidad por  
 referencia.

Actualmente existe un enorme interés económico en la producción de niveles elevados de proteínas recombinantes,  
 como las histonas. La producción de grandes cantidades de proteínas recombinantes no solo es de interés para la  
 20 finalidad de proporcionar una cantidad suficiente de proteína para estudiar sus propiedades y funciones, sino  
 también para el suministro de cantidades grandes de proteína para uso terapéutico.

Para el éxito de la producción de niveles elevados y de purificación de proteínas recombinantes se tiene que tener  
 en cuenta una gran cantidad de parámetros. Los parámetros importantes incluyen las condiciones de expresión, la  
 25 regulación de la traducción y la estabilidad del ARNm, las dianas proteicas y su degradación (Makrides, S.,  
 Microbiological Reviews, 1996: 512).

Un abordaje con el fin de mejorar la producción, detección y purificación de proteínas recombinantes es el uso de  
 una amplia variedad de parejas de fusión (Makrides, S., Microbiological Reviews, 1996: 512). Se han desarrollado  
 30 técnicas elaboradas para incluir marcadores de afinidad para la purificación y detección de proteínas recombinantes.  
 Dichos marcadores de afinidad combinan las ventajosas propiedades de permitir una purificación más eficaz al  
 tiempo que permiten también una fácil detección de la proteína recombinante usado el marcador. No obstante, en  
 muchos casos, la adición de un marcador de afinidad bastante grande puede suponer una ventaja debido a efectos  
 35 no deseados sobre la traducción, plegamiento y actividad de la proteína. Especialmente para usar en aplicaciones  
 terapéuticas suele ser necesaria la eliminación posterior del marcador de afinidad, de modo que se alivian algunos  
 de los efectos positivos (p. ej., detección fácil) que el marcador de afinidad confiere a la proteína (Gellissen, G.  
 "Production of Recombinant Proteins", 2005, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co: KgaA, Weinheim).

La incorporación de un residuo de metionina en el extremo N de cada polipéptido naciente constituye parte de la  
 40 señal de iniciación de la traducción universal, usado por procariontas así como por eucariotas. En *E. coli*, la  
 eliminación de estos residuos de metionina en el extremo N se consigue mediante la enzima citoplasmática  
 metionina aminopeptidasa (*map*) (Hirel y col., Biochemistry, 1989, 86:8247).

Se ha demostrado que el procesamiento eficiente del residuo de metionina en el extremo N de las proteínas  
 45 eucariotas recombinantes producidas en procariontas, por ejemplo en *E. coli*, depende del aminoácido adyacente a la  
 metionina. Aunque existen datos contradictorios para algunos de los aminoácidos, parece estar aceptado que la  
 probabilidad de escisión es mayor para los residuos de aminoácidos pequeños y sin carga Ala, Gly, Pro, Ser, Val,  
 Cys y Thr. Parece que cadenas laterales más grandes no son ventajosas para el procesamiento de la metionina  
 (Hirel y col., Biochemistry, 1989, 86:8247; Frottin y col. Mol. & Cell. Proteomics, 2006, 12:2336; Gellissen, G.  
 50 "Production of Recombinant Proteins", 2005, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co., KgaA, Weinheim).

Se piensa que el procesamiento de la metionina en N-terminal desempeña papeles importantes para la estabilidad  
 de la proteína (Gigliione y col. EMBO J., 2003,1:13), y también para la correcta función de la proteína, como se  
 muestra para, por ejemplo, MEF-2C, hemoglobina humana, interleucina-1, homólogos de la ARNasa A o  
 55 ribonucleasa de rana (Meierhans y Allemann, J. Biol. Chem., 1998, 273:26052; Adachi, K. y col., Protein Expr. Purif.,  
 2000, 20:37; Endo, S. y col., Biochemistry, 2001,40:914; Boix, E. y col., J. Mol. Biol., 1996,257:992; Liao, Y.D. y col.,  
 Nucleic Acids Res., 2003, 31:5247; Varshavsky, A., Proc., Natl. Acad. Sci., 1996, 93: 12142). Una teoría adicional en  
 cuanto a la razón por la cual la naturaleza ha conservado un sistema enzimático tan especializado para eliminar el  
 residuo de metionina es para reciclar el conjunto de metionina celular para economizar este aminoácido esencial  
 (Hirel y col., Biochemistry, 1989, 86:8247).

El documento EP1254166 describe la producción recombinante de proteínas histonas en *E. coli*. Dicha producción  
 recombinante de proteínas humanas se considera ventajosa para aplicaciones terapéuticas, así como más eficaz y  
 60 rentable en comparación con preparaciones de timo humano o de ternero. Además, la producción recombinante de  
 proteínas permite un mejor control de calidad durante el procedimiento de producción.

Pyo y col. (Pyo, S.H y col., Protein Expr. Purif., 2001, 1:38) describe la producción de la histona recombinante H1.5

en *E. coli* usando las propiedades fuertemente básicas de la histona para desarrollar un procedimiento eficaz para la purificación a gran escala de proteínas recombinantes.

5 Aunque en la estado de la técnica se ha mostrado una producción de niveles elevados de proteínas recombinantes, no obstante existe una sustancial necesidad de encontrar procedimientos adecuados de detectar la proteína recombinante resultante. Como se ha tratado anteriormente, el uso de marcadores de afinidad, tal como marcadores de his, está muy extendido en la técnica, pero puede suponer un problema para la producción de proteínas para uso terapéutico.

10 Por tanto, el problema técnico subyacente a la presente invención era proporcionar mejores polipéptidos eucariotas recombinantes que, por ejemplo, permitan una simplificación de la producción y la detección.

La solución a este problema técnico se obtiene mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

15 De acuerdo con esto, la presente invención se refiere en una primera realización a una molécula de ácido nucleico que (a) codifica un polipéptido que consiste en (aa) dos residuos de metionina como el primero y el segundo residuos de aminoácidos en el extremo N unidos mediante un enlace peptídico a (ab) una histona eucariota madura; (b) codifica un polipéptido que consiste en (ba) dos residuos de metionina como el primero y el segundo residuos de aminoácidos en el extremo N unidos mediante un enlace peptídico a (bb) un polipéptido eucariota maduro que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 % con la histona eucariota madura de (a) y que esencialmente conserva su actividad biológica; o (c) hibrida en condiciones rigurosas con la hebra complementaria de una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de (a) o (b), en el que dicha molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene al menos los dos residuos de metionina en el extremo N y que conserva esencialmente la actividad biológica del polipéptido de (a) o (b).

25 Las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención incluyen ADN, tal como ADNC o ADN genómico, ARN (p. ej., ARNm), también en forma sintética o semisintética, otros derivados sintéticos o semisintéticos de ADN o ARN (p. ej., PNA o fosforotioatos) y polímeros mixtos, hebras tanto sentido como antisentido. Pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico es ADN, incluido ADN genómico.

35 Para los fines de la presente invención, un ácido nucleico peptídico (PNA) es un tipo de poliamida de ADN análogo y las unidades monoméricas para los derivados de adenina, guanina, timina y citosina están disponibles comercialmente (Perceptive Biosystems). Ciertos componentes del ADN, como el fósforo, óxidos de fósforo o derivados de desoxirribosa, no están presentes en los PNA. Como han divulgado Nielsen y col., *Science* 254:1497 (1991) y Egholm y col., *Nature* 365:666 (1993), los PNA se unen específica y fuertemente a las hebras de ADN complementarias y no son degradados por las nucleasas. De hecho, el PNA se une con más fuerza al ADN de lo que lo hace el propio ADN. Probablemente esto se deba a que no existe repulsión electrostática entre las dos hebras y, también, a que la estructura de poliamida es más flexible. Por ello, los dúplex de PNA/ADN se unen en un abanico más amplio de condiciones rigurosas que los dúplex de ADN/ADN, lo que facilita la realización de hibridación con múltiples sondas. Se pueden usar sondas más pequeñas que con el ADN debido a la fuerte unión. Además, es más probable que se pueda determinar errores de apareamiento de una sola base con la hibridación de PNA/ADN porque un único error de apareamiento en un PNA/ADN de 15 unidades disminuye el punto de fusión (T.sub.m) en 8-20 °C frente a 4-16 °C para el dúplex de ADN/ADN de 15 unidades. Asimismo, la ausencia de grupos con carga en el PNA significa que la hibridación se puede realizar a fuerzas iónicas bajas y reduce la posible interferencia por sales durante el análisis.

50 El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, describe un grupo de moléculas que consisten en más de 30 aminoácidos. De acuerdo con la invención, el grupo de polipéptidos comprende "proteínas". Los polipéptidos pueden además formar dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir que consisten en más de una molécula polipeptídica. Las moléculas polipeptídicas que forman dichos dímeros, trímeros etc. pueden ser idénticas o no idénticas. Por consiguiente, las correspondientes estructuras de orden mayor se denominan homo o heterodímeros, homo o heterotrímeros etc. Los homo o heterodímeros, etc., también entran dentro de la definición del término "proteína". Los polipéptidos pueden además ser proteínas de fusión, en las que la pareja de fusión está unida por el extremo C al polipéptido de la invención. Dichos componentes de dichas proteínas de fusión, que no son secuencias de histona o fragmentos o variantes de la misma como se ha definido anteriormente en el presente documento, incluyen secuencias de aminoácidos que confieren las propiedades deseadas, tales como estabilidad modificada/potenciada, solubilidad modificada/potenciada y/o la capacidad de apuntar a uno o más tipos celulares específicos, o podrían conferir una actividad biológica diferente. Por ejemplo, se prevén las proteínas de fusión con anticuerpos específicos de marcadores de superficie celular o con fragmentos de reconocimiento antigénico de dichos anticuerpos. Adicionalmente, en la invención también se abarcan los peptidomiméticos de dichos polipéptidos en los que el (los) aminoácido(s) y/o enlace(s) peptídico(s) se han reemplazado con análogos funcionales. Dichos análogos funcionales incluyen todos los aminoácidos conocidos distintos a los 20 aminoácidos codificados en los genes, tales como selenocisteína. Los términos "polipéptido" y "proteína" también se refieren a polipéptidos/proteínas modificados de forma natural, en los que la modificación se efectúa mediante, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Dichas modificaciones son bien conocidas en la técnica.

El término "metionina", de acuerdo con la presente invención, es bien conocido para el experto en la materia. La metionina es un aminoácido esencial codificado por el codón AUG en el código genético estándar. Dicha metionina, como se encuentra en los organismos eucariotas, contribuye a una realización preferida de la invención. También dentro del significado del término metionina y contribuyendo a una realización alternativa de la invención es la N-formilmetionina de procariotas.

La expresión "primero y segundo residuo de aminoácido en el extremo N", como se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos localizados en las posiciones 1 y 2 del polipéptido de la invención. Estos residuos también se denominan en la técnica los residuos último y penúltimo en el extremo N. En otros términos, el primer residuo de metionina está localizado en el extremo N del producto de traducción inicial del polipéptido que contiene una metionina en su extremo N.

La expresión "enlace peptídico", como se usa en el presente documento, es bien conocida para el experto en la materia y se refiere al enlace químico formado entre dos moléculas de aminoácido en las que el grupo carboxilo de un aminoácido reacciona con el grupo amino del otro aminoácido.

La expresión "histona eucariota madura", de acuerdo con la presente invención, se refiere a una histona desprovista de su metionina inicial en el extremo N. Como es bien conocido para el experto en la materia, los polipéptidos se traducen usando una señal de iniciación de la traducción universal que conduce a la incorporación de metionina como residuo de aminoácido inicial del extremo N del polipéptido traducido. En eucariotas, y parcialmente también en procariotas, se separa esta metionina en el extremo N, lo que tiene como resultado la "maduración" del polipéptido.

De acuerdo con la presente invención, el término "histona" hace referencia a un grupo de proteínas que incluye las histonas del núcleo H2A (el número Swiss-Prot de la H2A humana es P02261), H2B (el número Swiss-Prot de la H2B humana es P02278), H3 (el número Swiss-Prot de la H3.1 humana es P16106) y H4 (el número Swiss-Prot de la H4 humana es P02304) y la familia de histonas ligadoras H1 (véanse más adelante los números Swiss-Prot). Tradicionalmente, las histonas se conocen como componentes estructurales del núcleo de la célula, donde actúan como "bobinas" alrededor de las cuales se enrolla el ADN, y desempeñan un papel crucial en la regulación génica. No obstante, las histonas demuestran una amplia multifuncionalidad (Reichhart, R. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 1985,82:4871; Reichhart, R. y col., FEBS 1985,188: 63). Por ejemplo, se ha descubierto que las histonas actúan sistémicamente como hormonas y factores de regulación, y también son portadoras de importantes funciones de protección.

Debido a su amplia multifuncionalidad, las histonas se han convertido en importantes en una serie de abordajes terapéuticos. Por ejemplo, se ha descubierto que las histonas H1, H2A y H2B estimulan los linfocitos sanos periféricos (Cebecauer, L. y col. Rheumatologia 1991, 5: 107). Se ha descubierto que la histona H1 mejora la regeneración muscular estimulando la proliferación de los mioblastos (Henriquez, J.P. y col., J. Cell Sci. 2002, 115:2041), para modular el estado de enfermedades con fibrillas de tipo amiloide (Duce, J.A. y col., J. Mol. Biol. 2006, 361 :493) y estimular las células madre (Semina y col. Radiation Biology and Oncology, 1994,34:544). La histona H1 también se puede usar para diagnosticar, prevenir y tratar la colitis ulcerosa y subtipos clínicos de la misma (Braun J. y col., patente de EE.UU. 6.074.835). Adicionalmente se ha descubierto que la histona H1, como las histonas del núcleo, puede transportar sustancias biológicamente activas a través de la barrera hematoencefálica (Pardridge, W.M. y col., J. Pharmacol. Exp. Ther. 1989, 251:821). Además, la patente europea 0392315 muestra una actividad hormonal o de tipo hormona de la histona H1 y sus subtipos. En, por ejemplo, la patente europea 0532979 o la solicitud de patente WO 03/044054 se ha mostrado un papel de las histonas en enfermedades autoinmunitarias, incluida, por ejemplo, el lupus eritematoso sistémico (LES). Además, se ha demostrado el uso de histonas en la prevención de la agregación de plaquetas (documento WO 02/067907) o para el tratamiento de la trombocitopenia (documento WO/2006/119912).

Asimismo, se ha descubierto que las histonas desempeñan un papel central en el tratamiento del cáncer. Vani y col. (Vani, G. y col., Chemotherapy 2003, 49:252) han demostrado que, por ejemplo, la histona H1 mejora el estado inmunológico y la respuesta inmunitaria en animales portadores de carcinoma de mama experimental. Asimismo, se ha demostrado que el estado antioxidante en individuos que sufren cáncer está potenciado por la histona H1 (Vani, G. y col., Chemotherapy 2005, 51: 57). También se ha demostrado que el tratamiento de las células de cáncer de mama sensible a estrógenos humanos con histona H1 reduce el número de receptores de estrógenos (Vani, G. y Devi, C.S., Mol. Cell Biochem. 2005, 272:151). El tratamiento de la leucemia o carcinoma inducidos por radiación con las histonas H1 o H2A:H2B se muestra en la patente de EE.UU. 5812257. Asimismo, las histonas pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer mediante secuestro del ADN extracelular patogénico y los nucleosomas patogénicos en la circulación sistémica (Le Lann-Terrisse y col. (1997) *Cancer Immunol Immunother*, 43:337).

De acuerdo con la presente invención, la molécula de ácido nucleico también puede codificar un polipéptido que consiste en dos residuos de metionina como el primero y el segundo residuos de aminoácidos en el extremo N unidos mediante un enlace peptídico a un polipéptido eucariota maduro que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, más preferentemente 85 %, más preferentemente una identidad de secuencia del 90 % con la histona

eucariota madura de (a) y que conserva esencialmente su actividad biológica. Incluso más preferentemente, la molécula de ácido nucleico puede codificar un polipéptido que consiste en dos residuos de metionina como el primero y el segundo residuos de aminoácidos en el extremo N unidos mediante un enlace peptídico a un polipéptido eucariota maduro que tiene una identidad de secuencia de al menos 95%, y más preferentemente una identidad de secuencia del 98 %, con la histona eucariota madura de (a) y que conserva su función biológica.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "porcentaje de identidad de secuencia" describe el número de correspondencias ("aciertos") de nucleótidos/aminoácidos idénticos de dos o más secuencias de ácido nucleico o aminoácido alineadas en comparación con el número de residuos de nucleótidos o aminoácidos que conforman la longitud de las secuencias de ácido nucleico o aminoácido (o la parte global comparada de las mismas). En otros términos, usando una alineación, se puede determinar el porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (p, ej., identidad del 80 % u 85 %) para dos o más secuencias o subsecuencias, cuando las (sub)secuencias se comparan y alinean para la correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o sobre una región designada, medido usando un algoritmo de comparación de secuencias conocido en la técnica, o cuando se alinean manualmente y se inspeccionan visualmente. Esta definición también se aplica a la complementaria de una secuencia problema. Las moléculas de ácido nucleico/polipéptidos preferidas de acuerdo con la invención son aquéllas en las que la identidad descrita existe sobre una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 a 25 aminoácidos o nucleótidos, más preferentemente sobre una región que tiene una longitud de aproximadamente 50 a 100 aminoácidos o nucleótidos. Los expertos en la técnica sabrán determinar el porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias usando, por ejemplo, algoritmos tales como los basados en el programa informático CLUSTALW (Thompson Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) o FASTA (Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., 1988, 85; 2444), como se conoce en la técnica.

Aunque el algoritmo FASTDB normalmente no considera para su cálculo las deleciones ni adiciones no apareadas internas en las secuencias, es decir huecos, se puede corregir manualmente para evitar una sobreestimación del 5 de identidad de secuencia. No obstante, el programa CLUSTALW sí tiene en cuenta los huecos en la secuencia para sus cálculos de identidad. Los expertos en esta técnica también disponen de los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 (Altschul, Nucl. Acids Res., 1977, 25:3389). El programa BLASTN para las secuencias de ácidos nucleicos usa como defecto una longitud de texto (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como parámetros por defecto una longitud de texto de 3 y una expectativa (E) de 10. La matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) usa alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras. Todos estos programas se pueden usar para los fines de la presente invención. Todos los programas anteriores se pueden usar de acuerdo con la invención.

De acuerdo con la presente invención, la actividad está esencialmente conservada si al menos se obtiene un 20 % de la actividad biológica de la correspondiente histona eucariota madura citada en el punto (a) anterior. Preferentemente se conserva al menos el 50 %, tal como al menos el 60 %, al menos el 75 % o al menos el 80 % de la actividad. Más preferido es que se conserve al menos el 90%, tal como al menos el 95%, incluso más preferido al menos el 98 %, tal como al menos el 99% de la actividad. Más preferido es que se conserve toda la actividad biológica, es decir el 100 %. También de acuerdo con la invención se encuentran los polipéptidos que tienen mayor actividad biológica en comparación con la histona eucariota madura citada en (a), es decir una actividad enzimática mayor del 100 % de la histona de referencia. El experto en la materia conoce bien los procedimientos para evaluar la actividad biológica de un poli(péptido) e incluyen, sin limitaciones, medir la actividad enzimática, la citotoxicidad, la liberación de citoquinas, la hemólisis o la expresión de biomarcadores. En particular, las pruebas de citotoxicidad son pruebas con cultivos celulares in vitro o in vivo, que se tratan con, por ejemplo, (poli)péptidos, por ejemplo histonas, y en las que el gradiente de mortalidad de las células se determina con procedimientos de detección celular tras el tratamiento. Asimismo, la actividad biológica se puede determinar con pruebas ELISA, especialmente en el caso de los anticuerpos.

El término "híbrida/que hibrida", como se usa en el presente documento, se refiere a un apareamiento de una molécula de ácido nucleico con una hebra (parcialmente) complementaria de esta molécula de ácido nucleico de modo que se forma un híbrido.

En la técnica se sabe bien cómo realizar experimentos de hibridación con moléculas de ácido nucleico. En consecuencia, el experto en la materia conoce las condiciones de hibridación que tiene que usar para que la hibridación tenga éxito. Existen referencias a la fijación de condiciones de hibridación adecuadas en libros de texto estándar, tales como Sambrook y Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989) o Higgins y Hames (Eds.) "Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC, (1985). En una realización preferida, la hibridación se realiza en condiciones estrictas.

"Condiciones de hibridación estrictas" se refiere a condiciones que comprenden, por ejemplo, una incubación durante la noche a 65 °C en 4x SSC (NaCl 600 mM, citrato sódico 60 mM), seguida de lavado a 65 °C en 0,1x SSC durante una hora. Como alternativa, las condiciones de hibridación pueden comprender: Una incubación durante la noche a 42 °C en una solución que comprende 50% de formamida, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM),

fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 0,1 x SSC a aproximadamente 65 °C. Dichas condiciones de hibridación también son conocidas para el experto en la materia como "condiciones altamente estrictas para hibridación". También se contemplan moléculas de ácido nucleico que hibridan con las moléculas de ácido nucleico de la invención en condiciones de hibridación menos estrictas ("condiciones para hibridación de rigurosidad baja"). Los cambios en la rigurosidad de la hibridación y la detección de señal se realizan principalmente mediante la manipulación de la concentración de formamida (porcentajes menores de formamida tienen como resultado menor rigurosidad), las condiciones de sales o la temperatura. Por ejemplo, condiciones de menor rigurosidad incluyen una incubación durante la noche a 50 °C en 4x SSC o una incubación durante la noche a 37 °C en una solución que comprende 6 x SSPE (20X SSPE= Na Cl 3M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2M, EDTA 0,02M, pH 7,4), 0,5 % de SDS, 30 % de formamida, 100 µg/ml de ADN bloqueante de esperma de salmón, seguido de lavados a 50 °C con 1 X SSPE, 0,1 % de SDS. Además, para conseguir una rigurosidad todavía menor se pueden realizar lavados tras la hibridación rigurosa con concentraciones de sales más altas (p. ej., 5 X SSC). Cabe destacar que se pueden conseguir las variaciones en las condiciones anteriores mediante la inclusión y/o sustitución de reactivos bloqueantes alternativos usados para suprimir los iniciales en los experimentos de hibridación. Reactivos bloqueantes típicos incluyen reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN de esperma de salmón desnaturalizado y formulaciones patentadas disponibles comercialmente. La inclusión de reactivos bloqueantes específicos puede requerir modificación de las condiciones de hibridación descritas con anterioridad debido a problemas de compatibilidad. En general, un experto en la materia puede efectuar dichas modificaciones sin más preámbulos. Un complejo de hibridación se puede formar en solución (p. ej., análisis de Cot o Rot) o entre una secuencia de ácido nucleico presente en solución y otra secuencia de ácido nucleico inmovilizada sobre un soporte sólido (p. ej., membranas, filtros, chip, pernos o portaobjetos de vidrio en los que se han fijado, por ejemplo, las células).

La realización citada con anterioridad en el presente documento se refiere, preferentemente, a condiciones muy rigurosas y, como alternativa, a condiciones de menor rigurosidad.

Además de lo anterior, la expresión "una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con la hebra complementaria de una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de (a) o (b)" como se cita en el punto (c) se refiere a, preferentemente, secuencias que muestran una identidad de secuencia de al menos el 70 %, preferentemente de al menos el 80 %, más preferentemente de al menos el 90 %, incluso más preferentemente de al menos el 95 % y los más preferentemente de al menos el 97 %, con una secuencia de nucleótidos como se ha descrito anteriormente en los puntos (a) o (b).

Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, de acuerdo con la presente invención se prefieren moléculas de ácido nucleico que sean capaces de hibridar con las moléculas de ácido nucleico de la invención, o con partes de las mismas, en condiciones de hibridación rigurosas (muy rigurosas), es decir que no sufren hibridación cruzada con las moléculas de ácido nucleico no relacionadas en la secuencia de nucleótidos. De acuerdo con el punto (c) anterior, las moléculas de ácido nucleico relacionadas pero no idénticas en la secuencia con las moléculas de ácido nucleico de los puntos (a) y (b) también entran dentro de la invención. Además, la invención comprende, de acuerdo con el punto (c), fragmentos de la molécula de ácido nucleico de (a) y (b). Para todas las realizaciones que entran dentro del punto (c), es esencial, de acuerdo con esta realización, que el polipéptido codificado por esta molécula de ácido nucleico tenga al menos dos residuos de metionina en el extremo N y que conserve o conserve esencialmente la actividad biológica de la histona de (a) o (b).

Además, en una realización preferida, la presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico cuya secuencia es degenerada en comparación con la secuencia de una molécula de ácido nucleico descrita anteriormente del punto (a) o (b). Cuando se usa de acuerdo con la presente invención, la expresión "ser degenerado como resultado del código genético" significa que, debido a la redundancia del código genético, diferentes secuencias de nucleótidos codifican el mismo aminoácido.

Aunque en la técnica se conocen numerosos marcadores de afinidad que se unen a polipéptidos para facilitar la producción y la detección, a menudo tienen que eliminarse estos marcadores para uso en aplicaciones terapéuticas. En contraste con estos marcadores de afinidad, sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto polipéptidos bis-met que muestran las mismas propiedades biológicas como sus homólogos naturales y, por tanto, los polipéptidos de la invención se pueden usar para fines terapéuticos. Como la funcionalidad de los polipéptidos de la invención no se altera de un modo detectable, al menos no con las pruebas empleadas por los inventores, la eliminación de los residuos de metionina no es necesaria. Además, durante la producción no se produce eliminación de los residuos de metionina. Como se ha indicado anteriormente, la escisión del residuo de metionina en el extremo N depende considerablemente del tamaño del segundo residuo de aminoácido. Dado que los polipéptidos de la presente invención contienen como segundo residuo de aminoácido otra metionina, un efecto observado es que sólo un porcentaje bajo, es decir en el intervalo de aproximadamente 20 %, de los dos residuos de metionina en el extremo N se escinden en *E. coli*. En aproximadamente el 80 % de los casos restantes, los dos residuos de metionina en el extremo N no se escinden. Durante la producción del polipéptido de la invención en procariontas, como *E. coli*, la última metionina en el extremo N también puede estar formilada. No obstante, los inventores no obtuvieron ningún producto formulado según el análisis de espectrometría de masas. Asimismo, no se pudo

observar la escisión del único residuo de metionina. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se supone que la escisión de los primeros residuos de metionina en el extremo N conduce a la rápida eliminación de la segunda metionina en el extremo N también, lo que tiene como resultado la escisión de ambos residuos de metionina.

5 A este respecto, las histonas bis-met de la invención ofrecen la ventaja de ser fácilmente detectables en presencia de la histona endógena. Por ejemplo, aunque es posible que las histonas bis-met no se puedan separar de su homóloga endógena por diferentes modos de HPLC (RPC; SEC; IEX) o electroforesis (SDS-PAGE, CE), la histona bis-met puede distinguirse fácilmente mediante espectrometría de masas de ionización por electronebulización (o tándem) (ESI-EM), por ejemplo la misma fracción RP-HPLC (véanse los ejemplos). Esto permite la monitorización de la farmacocinética de las histonas terapéuticas durante ensayos clínicos sin la necesidad de usar marcaje con isótopos o anticuerpos especiales frente al fármaco en investigación.

15 Además, sorprendentemente se ha descubierto que las histonas que contienen dos residuos de metionina como su primero y segundo residuo de aminoácido en el extremo N mostraban propiedades ventajosas en la producción recombinante. Por tanto, los inventores han descubierto que se podía obtener un nivel significativamente mayor de histona tras la introducción de los dos residuos de metionina. Aunque el rendimiento en la célula bacteriana tras la fermentación de histonas bis-met no fue significativamente mayor, sorprendentemente se encontró que el comportamiento de la histona bis-met era significativamente diferente en la primera etapa clave del procesamiento posterior. Aunque la histona bis-met pudo eluir a la salinidad prevista, la histona recombinante desprovista de los residuos de metionina adicionales no pudo eluir en la columna Macroprep High S sino a una salinidad muy elevada y no se pudo purificar después de un modo eficaz. En consecuencia, la histona bis-met muestra un comportamiento exquisito sobre la columna Macroprep High S, lo que permite un procedimiento de purificación eficaz y con un rendimiento elevado.

25 De acuerdo con esto, la presente invención se basa en el nuevo hallazgo de que la presencia de dos residuos de metionina en el extremo N de las histonas proporciona histonas bis-met que ofrecen la posibilidad de una simple detección en presencia de histonas endógenas y permite una eficaz producción de proteínas recombinantes.

30 En una realización preferida, la histona se selecciona del grupo que consiste en las histonas H1.0, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5 y H1t de testículo.

35 Los números de registro Swiss-Prot para los subtipos de histona H1 humana son: H1.0 P07305, H1.1 – Q02539, H1.2 - P16403, H1.3 - P16402, H1.4 - P10412, H1.5 - Q14529 y H1t - P22492. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la histona humana H1.2 se muestran en las SEC ID N° 6 y 7. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la histona humana H1.3 se muestran en las SEC ID N° 8 y 9. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la histona humana H1.4 se muestran en las SEC ID N° 10 y 11. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la histona humana H1.5 se muestran en las SEC ID N° 12 y 13.

40 En otra realización, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la molécula de ácido nucleico de la invención.

45 Las moléculas de ácido nucleico son "complementarias" si se unen de forma natural entre sí en condiciones permisivas de sal y temperatura mediante apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T-" se une a la secuencia complementaria "T-C-A". "Complementario" de acuerdo con la invención se refiere al apareamiento completo de las bases de los nucleótidos a lo largo de toda la longitud de la molécula de ácido nucleico de la invención. Por tanto, una molécula de ácido nucleico marcada con un marcador detectable no exactamente complementaria a la molécula de ácido nucleico de la invención no dará lugar a una señal detectable, si se escogen las condiciones de hibridación y lavado adecuadas. Dicha molécula de ácido nucleico complementaria puede usarse, por ejemplo, como sonda en análisis de transferencia Northern o Southern de las preparaciones de ARN o ADN.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona un oligo o polinucleótido antisentido de una molécula de ácido nucleico de la invención, en el que el oligonucleótido comprende los nucleótidos complementarios con los tripletes de nucleótidos que codifican los dos residuos de metionina en el extremo N de la histona de la invención y tiene una longitud mínima de 10 nucleótidos.

55 Dichos oligonucleótidos antisentido pueden usarse, por ejemplo, como cebadores para ensayos de secuenciación o como sondas en análisis de transferencia Northern o Southern de las preparaciones de ARN o ADN. Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención comprenden, preferentemente, al menos 10, preferentemente al menos 15, tal como al menos 25 nucleótidos consecutivos. Los polinucleótidos antisentido de la presente invención comprenden, más preferentemente, al menos 100, más preferentemente al menos 200 y más preferentemente al menos 500 nucleótidos de longitud. Dicha molécula de ácido nucleico también puede usarse como, por ejemplo, una sonda en ensayos de protección de ARNasa o como sonda antisentido para inhibir la expresión de las histonas de la presente invención. El experto en la materia está familiarizado con la preparación y uso de dichas sondas (véase, p. ej., Sambrook y Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY. (2001)).

En otra realización alternativa, la invención proporciona un vector que comprende la molécula ácido nucleico de la invención. Preferentemente, el vector es un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector usado convencionalmente en, por ejemplo, ingeniería genética. En una realización adicional, la invención proporciona un vector que comprende la molécula ácido nucleico complementaria o el oligonucleótido antisentido de la invención.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención se puede insertar en varios vectores disponibles comercialmente. Ejemplos no limitantes incluyen vectores plasmídicos procariotas, tales como la serie pUC, pBluescript (Stratagene), la serie pET de vectores de expresión, incluidos los vectores pETduet (Novagen) o pCARTOPO (Invitrogen) y vectores compatibles con expresión en células de mamífero como pREP (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pZ035, pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems) pTriEx-Hygro (Novagen) y pCINeo (Promega). Ejemplos de vectores plasmídicos adecuados para *Pichia pastoris* comprenden, por ejemplo, los plásmidos pA0815, pPIC9K and pPIC3.5K (todos de Invitrogen).

La molécula de ácido nucleico de la presente invención a la que se ha hecho referencia anteriormente también puede insertarse en vectores de modo que se genera una fusión traduccional con otra molécula ácido nucleico. La otra molécula ácido nucleico puede codificar una proteína que puede, por ejemplo, incrementar la solubilidad y/o facilitar la purificación de la proteína de fusión. Ejemplos no limitantes incluyen pET32, pET41, pET43. Los vectores también pueden contener una molécula ácido nucleico adicional expresable que codifica una o más chaperonas para facilitar un plegamiento correcto de la proteína. Los huéspedes de expresión bacteriana adecuados comprenden, por ejemplo, cepas derivadas de BL21 (tal como BL21(DE3), BL21 (DE3)PlysS, BL21 (DE3)RIL, BL21 (DE3)PRARE) o Rosetta®.

Véase en Sambrook y col. anteriormente, las técnicas de modificación de vectores. En general, los vectores pueden contener uno o más orígenes de replicación (ori) y sistemas de herencia para clonación o expresión, uno o más marcadores de selección en el huésped, por ejemplo resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión. Orígenes de replicación (ori) adecuados incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación de Col E1, del virus SV40 y de M 13.

Las secuencias codificantes insertadas en el vector pueden sintetizarse mediante, por ejemplo, procedimientos estándar, o aislarse de fuentes naturales. La unión de las secuencias codificantes en los elementos de regulación de la transcripción y/o las otras secuencias codificantes de aminoácidos se puede llevar a cabo usando procedimientos establecidos. Los elementos de regulación de la transcripción (partes de un casete de expresión) que aseguran la expresión en células procariotas o eucariotas son bien conocidos para los expertos en la técnica. Estos elementos comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción (p. ej., codón de iniciación de la traducción, promotores, potenciadores y/o aisladores), sitios internos de entrada en el ribosoma (IRES) (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 1471-1476) y, opcionalmente, señales de poli-A que garantizan la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores tanto de la transcripción como de la traducción y/o regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico de la invención está operativamente unida a dichas secuencias de control de la expresión que permite la expresión en células procariotas o eucariotas. El vector puede comprender además secuencias nucleotídicas que codifican señales de secreción como elementos de regulación adicionales. Dichas secuencias son bien conocidas para el experto en la materia. Además, dependiendo del sistema de expresión usada, las secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido expresado a un compartimento celular se pueden añadir a la secuencia codificadora de la molécula de ácido nucleico de la invención. Dichas secuencias líder son bien conocidas en la técnica.

Posibles ejemplos de elementos reguladores que garantizan el inicio de la transcripción comprenden el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor de SV40, el promotor de RSV (virus del sarcoma de Rous), el promotor lacZ, el promotor gai10, el promotor 1 $\alpha$  del factor de elongación humano, el potenciador de CMV, el promotor de la CaM quinasa, el promotor poliédrico del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) o el potenciador de SV40. Para la expresión en procariotas se ha descrito una multitud de promotores, incluidos, por ejemplo, el promotor tac-lac, el promotor lacUV5 o trp. Ejemplos de otros elementos reguladores en células procariotas y eucariotas comprenden señales de transcripción y de terminación, tales como el sitio SV40-Poli-A o el sitio tk-poli-A o las señales de poliadenilación de SV40, lacZ y AcMNPV poliédrico, posteriores en la molécula de ácido nucleico.

Adicionalmente se prefiere que el vector de la invención comprenda un marcador seleccionable. Ejemplos de marcadores seleccionables incluyen resistencia a neomicina, ampicilina e higromicina, kanamicina y similares. Vectores diseñados específicamente permiten el lanzamiento del ADN entre huéspedes diferentes, tales como células bacterianas-fúngicas o células bacterianas-animales (p. ej., el sistema Gateway® disponible en Invitrogen).

Un vector de expresión de acuerdo con la presente invención es capaz de dirigir la replicación y la expresión de la molécula de ácido nucleico y el polipéptido codificado de la presente invención. En la técnica se conocen vectores de expresión adecuados que comprenden los elementos de regulación descritos, tales como el vector de expresión



de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-Vitrogene, como se usa en, entre otros, los ejemplos adjuntos), pSPORT1 (GIBCO BRL) o pGEMHE (Promega), o vectores de expresión procariotas, tales como lambda gt11, pJOE, la serie pBBR1-MCS, pJB861, pBSMuL, pBC2, pUCPKS, pTACT1 o, preferentemente, el vector pET (Novagen).

Las moléculas de ácido nucleico de la invención, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, se pueden diseñar para la introducción directa o introducción mediante lipomas, vectores fagos o vectores virales (p. ej., adenovirus, retrovirus) en la célula. Adicionalmente, los sistemas de baculovirus o sistemas basados en virus de variolovacuna o en el virus del bosque Semliki se pueden usar como sistema de expresión eucariota para las moléculas de ácido nucleico de la invención.

Un vector de expresión en mamíferos típico contiene el elemento promotor que media en la iniciación de la transcripción de ARNm, la secuencia codificante proteica y las señales requeridas para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcrito. Además, también se pueden incluir elementos tales como el origen de replicación, el gen de resistencia a fármacos, reguladores (como parte de un promotor inducible). El promotor *lac* es un promotor inducible típico, útil para células procariotas, que se puede inducir usando el análogo de la lactosa *isopropiltiol-b-D-galactósido* ("IPTG"). Para la expresión recombinante y la secreción, la molécula de ácido nucleico de interés se puede unir entre, por ejemplo, la señal líder PelB, que dirige la proteína recombinante en el periplasma y el gen III en un fagemido denominado pHEN4 (descrito en Ghahroudi y col., 1997, FEBS Letters 414:521-526). Elementos adicionales podrían incluir potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donantes y aceptores para corte y empalme del ARN. Se puede conseguir una transcripción muy eficaz con los promotores tardío y temprano de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, por ejemplo RSV, HTLVI, HIVI, y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). No obstante, también se pueden usar elementos celulares (p. ej., el promotor de la actina humana). Los vectores de expresión adecuados para usar en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pSVL y pMSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) y pBC12MI (ATCC 67109). Entre las células huésped de mamífero que se pueden usar incluyen Hela humanas, 293, H9 y células Jurkat, NIH3T3 de ratón y células C127, células Cos 1, Cos 7 y CV1, células quail QC1-3, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO). Como alternativa, el polipéptido recombinante se puede expresar en líneas celulares estables que contienen la construcción génica integrada en un cromosoma. La cotransfección con un marcador seleccionable, tal como dhfr, gpt, neomicina, higromicina, permite la identificación y el aislamiento de las células transfeccionadas. El ácido nucleico transfeccionado también se puede amplificar para expresar cantidades grandes del polipéptido codificado. El marcador DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que portan varios cientos, o incluso varios miles, de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS). (Murphy y col., 1991, *Biochem J.* 227:277-279; Bebbington y col. 1992, *Bio/Technology* 10:169-175). Usando estos marcadores, las células de mamífero se cultivan en medio selectivo y se seleccionan las células con la mayor resistencia. Como se ha indicado anteriormente, los vectores de expresión incluirán, preferentemente, al menos un marcador seleccionable. Dichos marcadores incluyen resistencia a dihidrofolato reductasa, G418 o neomicina para cultivos celulares eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivos en *E. coli* y otras bacterias.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un huésped sometido a ingeniería genética con la molécula de ácido nucleico de la invención o con un vector de la invención. Dicho huésped se puede producir introduciendo dicha molécula de ácido nucleico o vector(es) en un huésped que con su presencia participa en la expresión del polipéptido de la invención.

El huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Procariotas/bacterias adecuadas son las que generalmente se usan para clonación, como *E. coli* (p. ej., las cepas de *E. coli* BL21 (DE3), HB101, DH5a, XL1 Blue, Y1090 y JM101), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces lividans*, *Lactococcus lactis*, *Mycobacterium smegmatis* o *Bacillus subtilis*. Un huésped eucariota adecuado puede ser una célula animal, tal como CHO, COS, 293 y células de melanoma de Bowes, una célula de anfibio, una célula de pescado, una célula de insecto tal como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, una célula fúngica, una célula vegetal, animales transgénicos no humanos o plantas transgénicas.

En una realización preferida de la presente invención, el huésped es una bacteria, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula fúngica, una célula de mamífero o una célula vegetal. Medios de cultivo adecuados y las condiciones para las células huésped descritas anteriormente son bien conocidos en la técnica.

En una realización preferida, el huésped que se va a someter a ingeniería genética con la molécula de ácido nucleico o el vector de la invención es *E. coli*, por ejemplo cepas derivadas de BL21 (tal como BL21(DE3), BL21 (DE3)PlysS, BL21(DE3)RIL, BL21 (DE3)PRARE) o Rosetta®.

En una realización adicional, la presente invención también se refiere a un procedimiento para producir bacterias o células eucariotas capaces de expresar un polipéptido de la invención, comprendiendo el procedimiento bacterias o células eucariotas sometidas a ingeniería genética con el vector de la presente invención. La expresión "sometido a ingeniería genética" se refiere al procedimiento de llevar al interior de una célula información genética o de modificar

la información genética de una célula. En general, esto se consigue transfeccionando o transformando una célula huésped con una molécula de ácido nucleico. La introducción de una construcción en la célula huésped puede efectuarse mediante transfección mediada por fosfato cálcico, DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros procedimientos. Dichos procedimientos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Sambrook y col., loc. cit. Anteriormente. Dicha molécula de ácido nucleico introducida en la célula huésped comprende un marco de lectura abierto que codifica el polipéptido de la presente invención.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento de producir un polipéptido de la invención, que comprende cultivar el huésped de la invención en condiciones adecuadas y aislar el polipéptido de la invención producido a partir de dicho huésped o cultivo.

En la técnica existe un gran número de procedimientos adecuados para producir polipéptidos en huéspedes adecuados. Si el huésped es un organismo unicelular, tal como una célula procariota, de mamífero o de insecto, el experto en la materia puede volver a diversas condiciones de cultivo. Convenientemente, la proteína producida se recoge del medio de cultivo, lisados de organismos cultivados o de membranas aisladas (biológicas) mediante técnicas establecidas. En el caso de un organismo multicelular, el huésped puede ser una célula que es parte de una parte del organismo, o derivar de la misma, por ejemplo, dicha célula huésped puede ser una parte recolectable de una planta. Un procedimiento preferido implica la producción recombinante de proteínas en huéspedes, como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que comprenden la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención se pueden sintetizar mediante PCR e insertar en un vector de expresión. Posteriormente, un huésped adecuado se puede transformar con el vector de expresión. Después, el huésped se cultiva para producir el polipéptido deseado, que se aísla y purifica. En la técnica se conocen bien dichos procedimientos (p. ej., Sambrook y col., anteriormente).

Un procedimiento alternativo para producir el polipéptido de la invención es la traducción in vitro del ARNm. Sistemas de expresión acelulares adecuados para uso de acuerdo con la presente invención incluyen lisado de reticulocitos de conejo, extracto de germen de trigo, membranas microsomales pancreáticas caninas, extracto S30 de *E. coli* y sistemas de transcripción/traducción acoplados, tal como el sistema TNT (Promega). Estos sistemas permiten la expresión de polipéptidos recombinantes tras la adición de vectores de clonación, fragmentos de ADN o secuencias de ARN que contienen regiones codificantes y elementos promotores adecuados.

Además de producción recombinante, el polipéptido (proteína), fragmentos de la proteína o la proteína de fusión de la invención se pueden producir de forma sintética, por ejemplo mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida (v. Stewart y col. (1969) Solid Phase Peptide Synthesis; Freeman Co, San Francisco; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963),2149-2154).

La síntesis de proteínas sintéticas puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automática se puede conseguir, por ejemplo, usando el Sintetizador Peptídico 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer, Foster City CA) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se pueden sintetizar químicamente varios fragmentos por separado y combinarse usando procedimientos químicos para producir la molécula de longitud completa. Como se ha indicado anteriormente, se puede usar la síntesis química, tal como el procedimiento de fase sólida descrito por Houghton (Proc. Natl. Acad. Sci., 1985,82: 5131). Además, el polipéptido (proteína), fragmentos de la proteína o la proteína de fusión de la invención se pueden producir de forma semisintética, por ejemplo mediante una combinación de producción recombinante y sintética. Todos los polipéptidos (proteínas) que tienen dos residuos de metionina como el primero y segundo residuo de aminoácido en el extremo N unidos mediante un enlace peptídico a (a) una histona eucariota madura; (b) un polipéptido eucariota maduro que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con una histona eucariota madura y que conserva esencialmente su actividad biológica; o (c) cualquier otro polipéptido de la invención, como se ha descrito anteriormente, así como fragmentos del polipéptido (proteína) y proteínas de fusión entran dentro del alcance de la presente invención con independencia del procedimiento de producción usado para obtenerlos. Esto es porque la secuencia de aminoácidos de todas estas proteínas también está codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención.

El aislamiento y purificación de proteínas se puede conseguir mediante una cualquiera de varias técnicas conocidas; por ejemplo, y sin limitaciones, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de líquidos de presión alta (HPLC), HPLC de fase inversa, cromatografía de interacción hidrofóbica y electroforesis en gel en disco preparativa. Las técnicas de aislamiento/purificación pueden requerir modificación de los polipéptidos de la presente invención usando procedimientos convencionales. Por ejemplo, además se puede añadir una cola de histidina a la proteína para permitir la purificación de una columna de níquel. Otras modificaciones pueden producir mayor o menor actividad, permitir niveles más elevados de producción proteica o simplificar la purificación de la proteína.

En una realización alternativa, la invención proporciona un polipéptido codificado por la molécula ácido nucleico de la invención o producirse mediante el procedimiento de la invención.

La invención también proporciona una composición que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector o el huésped o el polipéptido de la presente invención. Opcionalmente, el anticuerpo, aptámero o fago de la invención descritos más adelante también está contenido en dichas composiciones.

5 El término "composición", como se usa de acuerdo con la presente invención, se refiere a una composición que comprende al menos uno de los compuestos mencionados. Opcionalmente puede comprender moléculas  
adicionales capaces de alterar las características de los compuestos de la invención, por ejemplo, suprimiendo,  
estabilizando, bloqueando, modulando y/o activando su función. La composición puede estar en forma sólida, líquida  
10 o gaseosa y puede estar, entre otras, en forma de (un) polvo(s), (un) comprimido(s), (una) solución(es) o (un) aerosol(es).

En una realización preferida, la composición de la invención comprende además la histona eucariota madura.

15 Preferentemente, dicha composición comprende el polipéptido de la invención (histona bis-met) en una mezcla con la histona eucariota madura. Por tanto, la composición puede comprender una mezcla de histonas que contiene dos residuos de metionina en el extremo N e histonas desprovistas de ambos residuos de metionina. Preferentemente, la mezcla está en el intervalo del 90 % del polipéptido de la invención al 10 % de histona eucariota madura. Más preferentemente, la mezcla está en el intervalo del 80 % al 20 %, más preferentemente del 70 % al 30 %. Intervalos  
20 incluso más preferidos son de 50 % a 50 %, de 30 % a 70 % o de 20 % a 80 %. Más preferentemente, la mezcla está en el intervalo del 10 % del polipéptido de la invención al 90 % de histona eucariota madura. Dicha mezcla puede ser el resultado de la escisión parcial de la metionina de la histona bis-met debido a una actividad insuficiente de la metionina aminopeptidasa del organismo huésped. Como alternativa, la histona eucariota madura se puede añadir a la histona bis-met de la invención para obtener dicha mezcla. Preferentemente, las histonas de la mezcla son del mismo subtipo que H1 o H2A.

25 En otra realización preferida, la composición es una composición farmacéutica que además comprende opcionalmente un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición para  
30 administrar a un paciente, preferentemente un paciente humano. La composición farmacéutica de la invención comprende los compuestos citados anteriormente. La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender, opcional y adicionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "vehículo farmacéuticamente aceptable" se quiere decir una carga sólida, semisólida o líquida, diluyente, material de encapsulación o formulación auxiliar de cualquier tipo no tóxicos. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la  
35 técnica e incluyen soluciones de cloruro sódico, soluciones de cloruro sódico tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, disolventes orgánicos, incluidos DMSO etc. Preferentemente, el vehículo es un vehículo parenteral, más preferentemente una solución que es isotónica con la sangre del receptor. Adecuadamente, el vehículo contiene cantidades minoritarias de aditivos, tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química.  
40 Dichos materiales no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes, tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (meno de aproximadamente diez residuos), por ejemplo poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina;  
45 monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluidos celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como polisorbatos, poloxámeros o PEG.

50 El término "parenteral", como se usa en el presente documento, se refiere a los modos de administración que incluyen inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular e infusión.

Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular mediante procedimientos convencionales bien conocidos. En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto los componentes de la  
55 composición farmacéutica de forma uniforme e íntima con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o con ambos. A continuación, en caso necesario, se da la forma al producto en la formulación deseada.

Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto como una dosis adecuada. El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado de la atención y mediante factores clínicos. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosis para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluidos el  
60 tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto concreto que se va a administrar, el sexo, la hora y la vía de administración, el estado de salud general y otros fármacos que se estén administrando de forma concurrente. La cantidad terapéuticamente eficaz para una situación dada se determinará con facilidad mediante experimentación rutinaria y está dentro de las capacidades y juicio del clínico o médico habitual. En general, el régimen como administración regular de la composición farmacéutica deberá estar en el intervalo de 1 µg a 20 g de  
65 unidades al día. No obstante, una dosificación más preferida podría estar en el intervalo de 0,01 mg a 100 mg, incluso más preferentemente de 0,01 mg a 50 mg, y más preferentemente de 0,01 mg a 10 mg al día.

Los componentes de la composición farmacéutica que se va a usar para administración terapéutica deben ser estériles. La esterilidad se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles (p. ej., membranas de 0,2 micrómetros).

5 Los componentes de la composición farmacéutica se almacenarán habitualmente en contenedores de una unidad o de múltiples dosis, por ejemplo ampollas o viales sellados, como una solución acuosa o como una formulación liofilizada para reconstituir. Como ejemplo de una formulación liofilizada, viales de 10 ml se cargan con 5 ml de solución acuosa al 1/5 (p/v) esterilizada mediante filtración y la mezcla resultante se liofiliza. La solución para infusión se prepara reconstituyendo el(los) compuestos liofilizados usando agua para inyectables bacteriostática. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica puede comprender otros agentes en función del uso previsto de la composición farmacéutica.

15 La composición farmacéutica puede ser particularmente útil para el tratamiento de enfermedades, preferentemente enfermedades seleccionadas de las descritas con anterioridad en el presente documento, incluidas, por ejemplo, cáncer, trombocitopenia, infecciones tales como infecciones bacterianas, víricas o fúngicas, enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus eritematoso sistémico (LES) o artritis reumatoide, colitis ulcerosa, o enfermedades con fibrillas de tipo amiloide, tales como: enfermedad de Alzheimer (EA) y enfermedad de parkinson (EP), leishmaniasis, ciertas formas de miopatía o trastornos cardiovasculares relacionadas con acontecimientos trombóticos.

25 El cáncer, de acuerdo con la presente invención se refiere a una clase de enfermedades o trastornos que se caracterizan por la división incontrolada de las células y la capacidad de éstas para diseminarse, bien mediante crecimiento directo en el tejido adyacente por invasión o bien mediante implantación en sitios distantes por metástasis (cuando las células cancerosas se transportan a través de la corriente sanguínea o el sistema linfático).

30 La trombocitopenia, de acuerdo con la presente invención, se refiere a la presencia de relativamente pocas plaquetas en sangre, mientras que el recuento de plaquetas anormal generalmente varía de 140.000 a 400.000 por mm<sup>3</sup>.

35 Una infección de acuerdo con la presente invención es la colonización perjudicial de un organismo huésped por una especie extraña. En una infección, el organismo que infecta busca usar los recursos del huésped para multiplicarse (normalmente a expensas del huésped). La respuesta del huésped a la infección es la inflamación.

Las infecciones bacterianas de acuerdo con la presente invención incluyen, entre otras, meningitis bacterianas, cólera, difteria, listeriosis, pertussis (tos ferina), neumonía neumocócica, salmonelosis, tétanos, tifus, tuberculosis o infecciones de las vías urinarias.

40 Infecciones víricas de acuerdo con la presente invención incluyen, entre otras, mononucleosis, SIDA, varicela, resfriado común, infección por citomegalovirus, fiebre del dengue, fiebre hemorrágica de ébola, enfermedad del pie-mano-boca, hepatitis, gripe, paperas, poliomielitis, rabia, viruela, encefalitis vírica, gastroenteritis vírica, encefalitis vírica, meningitis vírica, neumonía vírica o fiebre amarilla.

45 Las infecciones fúngicas de acuerdo con la presente invención incluyen, entre otras, aspergilosis, blastomicosis, candidiasis, coccidiomicosis, criptococosis, histoplasmosis, histoplasmosis o tiña.

50 Enfermedades autoinmunitarias de acuerdo con la presente invención se refieren a enfermedades que se producen por una respuesta inmunitaria hiperreactiva del cuerpo contra sustancias y tejidos normalmente presentes en el cuerpo. Las enfermedades autoinmunitarias son bien conocidas para el experto en la materia e incluyen, entre otras, lupus eritematoso, encefalomiелitis diseminada aguda, anemia aplásica, hepatitis autoinmunitaria, diabetes mellitus, esclerosis múltiple, neuritis óptica o artritis reumatoide.

55 El lupus eritematoso de acuerdo con la presente invención se refiere a una enfermedad autoinmunitaria crónica (duradera) en la que el sistema inmunitario hiperreacciona y ataca al tejido normal. Este ataque tiene como resultado inflamación y conlleva síntomas. El lupus eritematoso es un tipo de enfermedad autoinmunitaria "inespecífico de órgano".

60 La artritis reumatoide de acuerdo con la presente invención es una enfermedad autoinmunitaria que hace que el sistema inmunológico del cuerpo ataque a las articulaciones óseas.

65 La colitis ulcerosa de acuerdo con la presente invención es una forma de enfermedad intestinal inflamatoria (EII). La colitis ulcerosa es una forma de colitis, una enfermedad del intestino, específicamente del intestino grueso o colon, que incluye úlceras características, o llagas abiertas, en el colon. El síntoma principal de enfermedad activa suele ser diarrea mezclada con sangre, de inicio gradual. No obstante, la colitis ulcerosa es una enfermedad sistémica que afecta a muchas partes del tejido fuera del intestino.

5 Enfermedades con fibrillas de tipo amiloide de acuerdo con la presente invención son enfermedades que comparten una característica común de que el péptido habitualmente soluble amiloide-beta o la proteína alfa-sinucleína se agrega en una estructura fibrilar ordenada que normalmente tiene como resultado una mayor lesión oxidativa, excitotoxicidad y alteración del ciclo celular. Enfermedades con fibrillas de tipo amiloide incluyen, entre otros, enfermedad de Alzheimer (EA) y enfermedad de Parkinson (EP).

10 La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo junto con disminución de las actividades de la vida cotidiana y síntomas neuropsiquiátricos o cambios conductuales. Es el tipo más habitual de demencia.

La enfermedad de Parkinson es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central que a menudo afecta a las capacidades motoras y el habla del enfermo.

15 La leishmaniasis es una enfermedad tripanosómica causada por especies de *Leishmania*, un organismo parásito del género trypanosome protozoa. La leishmaniasis se transmite por la picadura de una determinada especie de tábano y los síntomas son llagas en la piel, además de fiebre, daños en el bazo y el hígado, y anemia.

20 Las miopatías son enfermedades neuromusculares en las que las fibras musculares no funcionan, lo que tiene como resultado debilidad muscular. Se conocen varias clases de miopatía e incluyen, entre otras, por ejemplo, distrofias musculares, miopatías congénitas, miopatías mitocondriales o miopatías inflamatorias.

25 Los trastornos cardiovasculares relacionados con acontecimientos trombóticos, de acuerdo con la presente invención, se refieren a trastornos que incluyen, entre otros, trombosis venosa profunda o infarto de miocardio. Particularmente preferidas son los trastornos cardiovasculares relacionados con acontecimientos trombóticos mediados por la  $\gamma$ -trombina. "

En otra realización preferida, la composición de la invención es una composición diagnóstica.

30 De acuerdo con la presente invención, la expresión "composición diagnóstica" se refiere a composiciones para diagnosticar pacientes individuales una potencial respuesta o la capacidad para curar mediante las composiciones farmacéuticas de la invención. La composición diagnóstica de la invención comprende los compuestos citados anteriormente. La composición diagnóstica puede comprender además tampón(es) adecuado(s) y enzimas tales como transcriptasa inversa, polimerasas termoestables etc. Las composiciones diagnósticas pueden envasarse en un contenedor o en una pluralidad de contenedores.

40 La invención también proporciona un procedimiento de tratar y/o prevenir una enfermedad seleccionada de cáncer, trombocitopenia, infecciones, tales como infecciones bacterianas, víricas o fúngicas, enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus eritematoso sistémico (LES) o artritis reumatoide, colitis ulcerosa o enfermedades con fibrillas de tipo amiloide, tales como enfermedad de Alzheimer (EA) y enfermedad de Parkinson (EP), miopatía o trastornos cardiovasculares relacionados con acontecimientos trombóticos que comprenden administrar la composición farmacéutica de la invención a un sujeto que lo necesite.

45 La invención también proporciona el uso de la molécula de ácido nucleico o el vector o el huésped no humano o el polipéptido de la invención para la preparación de una composición para fines terapéuticos y/o diagnósticos.

50 En una realización preferida, la finalidad terapéutica es el tratamiento de cáncer, trombocitopenia, infecciones, tales como infecciones bacterianas, víricas o fúngicas, enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus eritematoso sistémico (LES) o artritis reumatoide, colitis ulcerosa o enfermedades con fibrillas de tipo amiloide, tales como enfermedad de Alzheimer (EA) y enfermedad de Parkinson (EP), miopatía o trastornos cardiovasculares relacionados con acontecimientos trombóticos.

55 En una realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo o aptámero o fago que se une específicamente a la molécula de ácido nucleico o al polipéptido de la invención pero no se une a la correspondiente histona eucariota madura.

Dicho anticuerpo pueden ser un anticuerpo monoclonal o policlonal.

60 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos de una cadena o fragmentos de los mismos que se unen específicamente dicho péptido o polipéptido, incluidos también anticuerpos biespecíficos, anticuerpos sintéticos, fragmentos de anticuerpos, tales como Fab, a F(ab<sub>2</sub>)', fragmentos Fv o scFv etc., o un derivado químicamente modificado de cualquiera de estos. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante, por ejemplo, las técnicas inicialmente descritas en Köhler y Milstein, Nature 256 (1975), 495, y Galfré, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3, que comprenden la fusión de células de mieloma de ratón con células de bazo derivadas de mamíferos inmunizados con modificaciones desarrolladas por la técnica. Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos frente a los péptidos mencionados anteriormente se pueden obtener usando

procedimientos que se describen en, por ejemplo, Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Cuando dichos anticuerpos se obtienen mediante la técnica de expresión en fagos, se puede usar resonancia en plasmón superficial tal como se emplea en el sistema BIAcore para incrementar la eficiencia de los anticuerpos de fagos que se unen a un epítipo del péptido o polipéptido de la invención (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe en, por ejemplo, el documento WO89/09622. Una fuente adicional de anticuerpos que se van a usar de acuerdo con la presente invención son los denominados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos, tales como anticuerpos humanos en ratones, se describe en, por ejemplo, los documentos WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735. Los anticuerpos que se van a usar de acuerdo con la invención o su(s) correspondiente(s) cadena(s) de inmunoglobulina se pueden modificar adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, usando, por ejemplo, delección(es), inserción(es), sustitución(es), adición(es) y/o recombinación(es) de aminoácidos, y/u otra(s) modificación(es) conocidas en la técnica, solas o en combinación. El experto en la materia conoce bien los procedimientos de introducción de dichas modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina, véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

El término "monoclonal" o "anticuerpo policlonal" (véase Harlow and Lane, (1988), *loc. cit.*) también se refiere a derivados de dichos anticuerpos que conservan o conservan esencialmente su especificidad de unión. Aunque más adelante en el presente documento se especifican realizaciones particularmente preferidas de dichos derivados, otros derivados preferidos de dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que comprenden, por ejemplo, una región variable de ratón o de rata y una región constante humana.

La expresión "fragmento de scFv" (fragmento Fv monocatenario) se conoce bien en la técnica y se prefiere debido a su pequeño tamaño y la posibilidad de producir de forma recombinante dichos fragmentos.

Preferentemente, el anticuerpo, aptámero, fragmento o derivado del mismo, de acuerdo con la invención se une específicamente a la proteína, polipéptido o fragmento o epítipo de los mismos diana cuya presencia o ausencia se debe monitorizar.

La expresión "se une específicamente" usada de acuerdo con la presente invención significa que el anticuerpo etc. no, o esencialmente no, sufre reacción cruzada con polipéptidos de estructuras similares o con el polipéptido eucariota maduro que no tiene dos metioninas en el extremo N. La reactividad cruzada de un panel de anticuerpos etc. en investigación se puede analizar mediante, por ejemplo, evaluación de la unión de dicho panel de anticuerpos etc., en condiciones convencionales (véase, por ejemplo, Harlow and Lane, (1988), *loc. cit.*) al polipéptido de interés, así como a una serie de polipéptidos más o menos relacionados estrechamente (estructuralmente y/o funcionalmente). Sólo dichos anticuerpos que se unen al polipéptido/proteína de interés pero que no se unen o no se unen esencialmente a cualquiera de los otros polipéptidos que se expresan preferentemente en el mismo tejido que el polipéptido de interés, se consideran específicos del polipéptido/proteína de interés y se seleccionan según estudios adicionales de acuerdo con el procedimiento de la invención.

En una realización particularmente preferida del procedimiento de la invención, dicho anticuerpo o porción de unión a anticuerpo es o deriva de un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. La expresión "anticuerpo humanizado" significa, de acuerdo con la presente invención, un anticuerpo de origen no humano, en el que al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) en las regiones variables, tales como CDR3 y, preferentemente las 6 CDR, ha sido sustituida por CDR de un anticuerpo de origen humano que tiene una especificidad deseada. Opcionalmente, la(s) región(es) constante(s) no humana(s) del anticuerpo se ha(n) sustituido por (una) región(es) constante(s) de un anticuerpo humano. En, por ejemplo, los documentos EP-A1 0 239 400 y WO90107861 se describen procedimientos para la producción de anticuerpos humanizados.

Los aptámeros son moléculas de ADN o ARN que se han seleccionado a partir de grupos aleatorios basados en su capacidad para unirse a otras moléculas. Se han seleccionado aptámeros que se unen ácido nucleico, proteínas, compuestos orgánicos pequeños e incluso organismos enteros. En <http://aptamer.icmb.utexas.edu/> se mantiene una base de datos de aptámeros.

Más específicamente, los aptámeros se pueden clasificar como aptámeros de ADN o ARN o aptámeros peptídicos. Mientras que el primer consiste en hebras (normalmente cortas) de oligonucleótidos, el último consiste en un dominio peptídico corto variable unido por ambos extremos a un armazón proteico.

Los aptámeros de ácido nucleico son especies de ácido nucleico que se han sometido a ingeniería mediante ciclos repetidos de selección *in vitro* o equivalente, SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial) para unirse a varias dianas moleculares, tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos e incluso células, tejidos y organismos.

Los aptámeros peptídicos son proteínas que están diseñadas para interferir con otras interacciones proteicas dentro de las células. Consisten en un bucle peptídico variable unido a ambos extremos de un armazón proteico. Este doble

- restricción estructural incrementa considerablemente la afinidad de unión del aptámero peptídico a niveles comparables con los de un anticuerpo (intervalo nanomolar). Normalmente, la longitud del bucle variable está compuesta de 10 a 20 aminoácidos y el armazón puede ser cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad. Actualmente, la proteína bacteriana tioredoxina A es la proteína armazón más usada, estando el bucle variable insertado dentro del sitio activo reductor, que es un bucle -Cys-Gly-Pro-Cys- en la proteína silvestre, siendo las dos cadenas laterales de cisteína capaces de formar un puente disulfuro. La selección del aptámero peptídico se puede realizar usando sistemas diferentes, pero el más usado actualmente es el sistema de dos híbridos de levadura.
- Los aptámeros ofrecen la utilidad de aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas, ya que ofrecen propiedades de reconocimiento molecular que rivalizan con las de las biomoléculas de uso habitual, en particular anticuerpos. Además de su reconocimiento discriminado, los aptámeros ofrecen ventajas sobre los anticuerpos, ya que se pueden someter a ingeniería totalmente en un tubo de ensayo, se producen fácilmente mediante síntesis química, poseen propiedades de almacenamiento deseables y provocan poca o ninguna inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas.
- Los aptámeros no modificados se eliminan rápidamente de la circulación sanguínea, con una semivida de minutos a horas, principalmente a causa de la degradación por la nucleasa y el aclaramiento del cuerpo mediante los riñones, como resultado del peso molecular bajo inherente al aptámero. Actualmente, las aplicaciones de los aptámeros no modificados se centran en el tratamiento de afecciones transitorias, tales como la coagulación de la sangre, o el tratamiento de órganos, como el ojo, en los que es posible la liberación local. Este rápido aclaramiento puede ser una ventaja en aplicaciones tales como pruebas de imagen diagnósticas *in vivo*. Para los científicos están disponibles varias modificaciones, tales como pirimidinas 2'-fluorin-sustituidas, polietilenglicol (PEG) etc., con las que la semivida de los aptámeros se puede incrementar fácilmente a una escala de tiempo de días o incluso semanas.
- Los fagos de acuerdo con la presente invención se refieren a fagos recombinantes y son bien conocidos en la técnica, y se describen en, por ejemplo, Griffiths, A.D. y col. EMBO J. 1994, 13:3245. El fago puede portar fragmentos de inmunoglobulinas o derivados con una especificidad de unión deseada por el polipéptido de la invención como una proteína de fusión sobre su superficie, en la que la pareja de fusión es una molécula de superficie del fago.
- En una realización preferida del procedimiento de la invención, dicho anticuerpo o aptámero o fago está marcado de forma detectable. Mientras que los aptámeros están marcados, preferentemente, radiactivamente con  $^3\text{H}$  o  $^{32}\text{P}$  o con un marcador fluorescente, tal como se ha descrito anteriormente, el fago o anticuerpo puede estar marcado, por ejemplo, de un modo correspondiente (con  $^{131}\text{I}$  como el marcador radioactivo preferido) o puede estar marcado con un marcador tal como una cola de His, Marcador FLAG o marcador myc.
- En una realización alternativa, la invención proporciona una composición diagnóstica que comprende dicho anticuerpo, aptámero y/fago. Dicha composición puede comprender además tampón(es) adecuado(s) y enzimas tales como transcriptasa inversa, polimerasas termoestables etc.
- Dicha composición diagnóstica puede usarse para analizar la presencia del polipéptido de la invención en, por ejemplo, un inmunoensayo usando el anticuerpo de la invención. El término "inmunoensayo", como se usa en el presente documento, comprende procedimientos como, por ejemplo, inmunoprecipitación, inmunotransferencia, ELISA, RIA, experimentos de inmunofluorescencia indirecta y similares. Dichas técnicas se conocen bien en la técnica y se describen en, por ejemplo, Harlow y Lane, anteriormente.
- En una realización alternativa, la invención proporciona un procedimiento para analizar la presencia de la molécula de ácido nucleico o el polipéptido de la invención, que comprende someter a ensayo una muestra obtenida de un sujeto para detectar la presencia de dicha molécula de ácido nucleico o polipéptido.
- Los procedimientos para analizar una muestra para analizar la presencia de la molécula de ácido nucleico de la invención comprenden, entre otros, ensayos de amplificación del ácido nucleico, secuenciación e hibridación.
- Ejemplos de ensayos de amplificación del ácido nucleico y medios para realizarlos incluyen, sin limitaciones, PCR (incluida PCR anidada, RT-PCR, ensayos de extensión con PCR, amplificación de bases en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), PCR de polimorfismos de confirmación de una cadena (SSCP)), sistemas de mutación resistente a la amplificación (ARMSTM) y ensayos de extensión lineal del sistema de mutación resistente a la amplificación (ALEXTM). Los detalles de dichos procedimientos se pueden encontrar en la técnica, véase, por ejemplo, Newton y col., Nucleic Acids Res. 17 (1989) 2503-2516; Agrawal (Ed.), "Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology, 20)", Humana Press. 1993; Haque y col., Diagn. Mol. Pathol. 7 (1998) 248-252; Innis y col. (Ed.), "PCR Applications: Protocols for Functional Genomics", Academic Press, 1999; Chen y Janes (Ed.), "PCR Cloning Protocols: From Molecular Cloning to Genetic", 2ª edición, Humana Press, 2002; Pissard y col., Clin. Chem. 48 (2002) 769-772; Steemers y col., Nature Meth. 3 (2006) 31-33; Kakavas y col., J. Clin. Lab. Anal. 20 (2006) 1-7.

Ejemplos de ensayos de secuenciación comprende, sin limitaciones, abordajes del análisis de la secuencia mediante secuenciación directa, SSCP fluorescente en un secuenciador de ADN automático y pirosecuenciación. Estos procedimientos son habituales en la técnica, véase, por ejemplo, Adams y col. (Ed.), "Automated DNA Sequencing and Analysis", Academic Press, 1994; Alpey, "DNA Sequencing: From Experimental Methods to Bioinformatics", Springer Verlag Publishing, 1997; Ramón y col., J. Transl. Med. 1 (2003) 9; Meng y col., J. Clin. Endocrinol. Metab. 90 (2005) 3419-3422.

Ejemplos de ensayos de hibridación comprenden, sin limitaciones, ensayos de transferencia Northern y Southern, análisis heterodúplex, detección de mutaciones mediante hibridación de oligonucleótidos específica de secuencia, hibridación de oligonucleótidos específica de alelos sobre matrices de ADN, ensayos basados en tecnología Illumina®, ensayos basados en la tecnología BeadArray®, véase, por ejemplo, Barnes y col., Nucleic Acids Res. 33 (2005) 5914-5923; Fan y col., Biotechniques 39 (2005) 583-588; Shen y col., Mutat. Res.-Fund. Mol. M. 573 (2005) 70-82; Steemers y Gunderson, Pharmacogenomics, 6 (2005) 777-782.

Ejemplos para ensayos basados en la detección de proteínas incluyen, sin limitaciones, etapas de procedimiento tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, HPLC de fase inversa, electroforesis en gel en disco, electroforesis capilar, análisis de transferencia de tipo Western, inmunoprecipitación, secuenciación de aminoácidos, procedimientos espectroscópicos (UV, CD, IRM Fluoreszenz) y espectrometría de masas (p. ej., EM-QTOF), véase, por ejemplo, Soejima y Koda, Transfusion 45 (2005) 1934-1939; Yeh y col., Anesth. Analg. 101 (2005) 1401-1406; Chou y col., Am. J. Clin. Pathol. 124 (2005) 330-338.

Los ensayos descritos anteriormente se conocen en la técnica en, por ejemplo, libros de texto estándar, tales como Lottspeich, Engel "Bioanalytik" Spektrum Akademischer Verlag (2006); Sambrook" Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989); Higgins y Harnes (Eds.) "Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC, (1985); Nollau y col., Clin. Chem. 43 (1997), 1114-1128; El uso de algunos de los ensayos citados se describe en los ejemplos adjuntos.

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, dicha muestra es sangre, suero, plasma tejido fetal, saliva, orina, tejido mucoso, mucus, tejido vaginal. El tejido fetal se obtiene de la vagina, la piel, el pelo, folículos pilosos u otro tejido humano.

Preferentemente, la muestra es sangre, suero, plasma, saliva, orina, tejido mucoso, mucus.

La invención también se refiere a un kit que comprende la molécula de ácido nucleico, el vector, el huésped no humano, el polipéptido o el anticuerpo, aptámero y/o fago de la invención en uno o más contenedores.

Las figuras muestran:

Figura 1: Visión general esquemática del procedimiento de purificación

Figura 2: Espectro de masas QTOF del lote clínico B1, M-H1A-P02

Figura 3: Espectro de masas QTOF del lote clínico B2, M-H1A-Pool01

A continuación, la invención se describirá en referencia a los ejemplos siguientes, que son meramente ilustrativos y no se interpretarán como limitantes del ámbito de la presente invención.

### **Ejemplo 1: Clonación de construcciones hH1.3**

#### **Construcción del vector plasmídico pEGT1-rH1.3S1**

Como se muestra en la SEC ID N° 1, histonas que muestran una fuerte carga positiva resultante de un contenido muy alto de residuos de lisina. Dado que el uso del codón para lisina difiere considerablemente entre Escherichia coli y el ser humano, se realizó una optimización de codones con el fin de adaptar la secuencia de la histona H1.3 humana al uso de codones de E. coli.

Se produjo un gen sintético cuya secuencia se proporciona en la SEC ID N: 2. La secuencia artificial estaba flanqueada por dos sitios de restricción, BspH1 y BamH1, para permitir la posterior introducción en el vector de expresión pEGT1. El codón de iniciación de la traducción ATG se incorporó en un sitio de restricción Nco1 CCATGG. El codón ATG inicial se duplicó, lo que proporciona un sitio TCATGA para BspH1 cuyo extremo CATG cohesivo es compatible con Nco1. Por tanto, un segundo residuo de metionina se incorporó después del primero. Tras el codón de terminación TAA se introdujo un sitio GGATCC adicional para BamH1. La secuencia de aminoácidos codificada por este gen artificial se proporciona en la SEC ID N° 3.



El gen optimizado se escindió de su plásmido mediante digestión con BspH1 y BamH1 y se insertó en el vector de expresión pEGT1 linearizado mediante NCO1 y BamH1 de acuerdo con protocolos estándar, para dar el plásmido pEGT1-rH13S1.

- 5 El vector pEGT1-rH13S1 ligado se introdujo en la cepa de *E. coli* electrocompetente BL21[DE3] mediante electroporación usando un protocolo estándar y las células transformadas se seleccionaron en placas LB suplementadas con kanamicina. Se seleccionó un clon y la secuencia del inserto que codifica la histona se verificó para determinar su coincidencia perfecta con la SEC ID N° 2.

## 10 **Construcción del vector plasmídico pEGT1-rH1.3S2**

- 15 Con el fin de suprimir la inserción de una segunda metionina en la construcción rH13S1 se usó un segundo gen sintético. El segundo codón TCC original que codifica una Serina se cambió a AGC también codificador de Serina para asegurar la compatibilidad con el sitio BspH1. La secuencia de ADN se proporciona como SEC ID N° 4 y la proteína recombinante codificada por este gen artificial se proporciona como SEC ID N° 5. Se usó la misma estrategia de clonación que se ha indicado anteriormente para pEGT1-rH13S1, ya que el gen artificial de la SEC ID N° 4 estaba flanqueado por el sitio de restricción TCATGA para BspH1 en el codón iniciador y BamH1 para CCATGG un par de bases después del codón de terminación.

- 20 El gen optimizado se escindió de su plásmido mediante digestión con BspH1 y BamH1 y se insertó en el vector de expresión pEGT1 linearizado mediante NCO1 y BamH1 de acuerdo con protocolos estándar, para dar el plásmido pEGT1-rH13S2.

- 25 El vector pEGT1-rH13S2 ligado se introdujo en la cepa de *E. coli* electrocompetente BL21[DE3] mediante electroporación usando un protocolo estándar y las células transformadas se seleccionaron en placas LB suplementadas con kanamicina. Se seleccionó un clon y la secuencia del inserto que codifica la histona se verificó para determinar su coincidencia perfecta con la SEC ID N° 4.

## 30 **Ejemplo 2: Producción recombinante de la histona H1.3**

### 30 **La cepa**

- 35 La bacteria usada en la preparación de rh1.3S es una cepa recombinante de *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pEGT1/H1.3S. Las construcciones se usaron para transformar la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*. Se seleccionaron tres clones para realizar una detección selectiva de expresión y se seleccionó un clon para efectuar una siembra pre-maestra (Pre-MS-05L23-H1 B). Se ha producido una Siembra Maestra (MS-06D05-H1B) usando la Pre-MS-05L23-H1B y se ha producido una Siembra de Trabajo (WS-06D06-H1B) usando la Siembra Maestra.

### 40 **Cultivo de siembra**

- 40 En dos matraces de agitación de 2 litros cada uno con 500 ml de medio YES (30 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl) se inoculan 100 µl de la Siembra de Trabajo (WS-06D06-H1B). El cultivo se incuba a 37 °C con una agitación de 270 rpm durante 5 horas (+/- 0,5 horas) para llegar a una DO (600 nm) superior a 1,5.

### 45 **Fermentación**

- 50 Se prepara un fermentador de 100 litros con 100 litros de medio NRJ18. El fermentador se esteriliza durante 30 minutos a 123 °C. Tras la esterilización y antes de la inoculación, se añaden 50 ml de SAG 471 (antiespumante) en condiciones de asepsia. En el fermentador se inocula el cultivo de la siembra con el fin de alcanzar una densidad óptica inicial teórica a 600 nm de  $8,75 \cdot 10^{-7}$ .

El volumen del inóculo calculado se añade a un frasco de transferencia que contiene 500 ml de medio YES.

- 55 La fermentación se realiza durante la noche a 37 °C. Durante el procedimiento de fermentación, el pH se mantiene a  $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$  mediante la adición periódica de NaOH 4M y HNO<sub>3</sub> 2,24M, El oxígeno disuelto se regula mediante retroalimentación con agitación al 30 %.

- 60 Cuando el cultivo alcanza una DO<sub>600</sub> entre 15 y 20, se induce el cultivo con una solución de IPTG 1 mM (23,8 g disueltos en 500 ml de agua altamente purificada).

- Tras 1h30 de inducción, la DO<sub>600</sub> es más de 24 y el fermentador se enfría hasta una temperatura por debajo de 16 °C. La regulación del pH lo mantiene a  $7,0 \pm 0,2$ . Otros parámetros se mantienen constantes durante el enfriamiento, a excepción de la presión, que se reduce a 30 kPa y la agitación a 200 rpm.

- 65 Cuando la temperatura del medio es inferior a 16° C, se estima el volumen del cultivo. El cultivo completo se centrifuga con 2 centrifugas Beckman Centrifugas JA10 equipadas con un rotor JLA 8.1000 ( $\pm 6$  l/centrifuga):5200

rpm- 4°C- 20 minutos.

Los sedimentos celulares se recogen y almacenan progresivamente a -20° C durante la etapa de centrifugación.

## 5 Rotura celular en un homogeneizador de alta presión

El día antes de la rotura celular, las células concentradas correspondientes a 100 litros de cultivo se descongelan a temperatura ambiente.

10 El día de la rotura, los sedimentos celulares se diluyen a 250 g/l en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM.12 H<sub>2</sub>O a pH 7,0 y la temperatura de las suspensión se incrementa a 30 °C.

15 Después, la suspensión se homogeneiza en un propelente Heidolph R2R2100. Después, las células se lisan en un homogeneizador de alta presión PONY (80.000 kPa). La suspensión celular se trata dos veces mediante el homogeneizador celular.

### Ejemplo 3: Purificación de proteínas

20 Todas las etapas de purificación se realizan sobre el volumen total del fermentador (es decir, 100 l).

#### 1. Precipitación con 2,5 % de ácido perclórico y extracción con urea 8M

25 A la masa celular recogida se añade 1/7 del volumen de HClO<sub>4</sub> 20 % (concentración final: 2,5 %).. La suspensión se homogeneiza antes de un tercer ciclo en el homogeneizador Pony a 25.000 kPa. La solución se mantiene en agitación suave durante una hora a temperatura ambiente. Después, la suspensión se centrifuga durante 15 minutos (12.200 g-7.000 rpm, 4 °C). Se recoge el sobrenadante, el pH se ajusta a 4,0 ± 0,1 con NaOH 10M y se filtra a través de una membrana Sartopore 2 de 0,45/0,22 μm (2000 cm<sup>2</sup>) en una bolsa estéril.

30 Se añade urea para obtener una concentración de 8M en un volumen final doble, ajustándose el volumen con tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,0. La solución se mantiene en agitación suave durante la noche a temperatura ambiente. Después, el pH se ajusta a 4,0 ± 0,1 con HCl 37 % o NaOH 10M.

#### 2. Cromatografía de intercambio aniónico de flujo rápido en sefarosa (QSFF) - modo negativo

35 El objetivo de esta etapa es una reducción del contenido en endotoxina y ADN. La cromatografía de intercambio aniónico se realiza con Sefarosa Q de flujo rápido (Biosciences n° cat. 17-0510-05) empaquetada en una columna Moduline 350/500 (Millipore BioProcess Division n° cat 86351211).

40 La columna se empaqueta en agua altamente purificada a un caudal eluyente de 120 cm/h (115,4 l/h). Las dimensiones del lecho de la columna empaquetada son: diámetro 25 cm, área transversal = 961 cm<sup>2</sup>, lecho= 18 cm, volumen empaquetado= 17,314 ± 0,962 l. La columna se desinfecta con de 1,5 a 2,5 de volumen de la columna (CV) de NaOH 1M + NaCl 2M con un tiempo de contacto de 2 horas a un caudal de 96,2 l/h (100 cm/h- 1603 ml/min).

45 Todas las etapas cromatográficas se realizan a un caudal lineal de aproximadamente 100 cm/h (± 96,2 l/h). El pH se estabiliza con de 1 a 2 CV de acetato amónico 50 mM + NaCl 1M a pH, 4,0. Después, la columna se equilibra con de 3,5 a 5 CV de acetato amónico 50 mM + urea 8M a pH 4,0.

50 La solución de extracción de urea (véase la sección 1) se diluye aproximadamente 1,5 veces con acetato amónico 50 mM + urea 8M a pH, 4,0, con el fin de obtener una conductividad menor de 10 mS/cm. Sólo 8 CV de la solución de extracción de urea (antes de la dilución) se cargan al mismo tiempo. La proteína H1 se recoge en el flujo mínimo, realizándose el equilibrio-elución con de 1,5 a 2,5 CV de acetato amónico 50 mM + urea 8M a pH, 4,0.

55 Tras la elución, la columna se limpia con de 1,5 a 2,5 CV de acetato amónico 50 mM + NaCl 1M a pH 4,0. Esta elución en NaCl 1M permite eliminar el ADN y las endotoxinas. Después, la columna se desinfecta con de 1,5 a 2,5 CV de NaOH 1M + NaCl 2M (2 horas) y se almacena a temperatura ambiente en NaOH 20 mM.

#### 3. Cromatografía de intercambio catiónico rica en S Macroprep (MHS-E)- modo positivo:

60 La cromatografía de intercambio catiónico se realiza con Macroprep High S (Bio-Rad Laboratories 156-0033) empaquetada en una columna Vantage 180/500 (Millipore BioProcess Division n° cat 87018001). La columna se empaqueta en agua altamente purificada a un caudal eluyente de 260 cm/h 66,1 l/h). Las dimensiones del lecho de la columna empaquetada son: diámetro 18 cm, área transversal = 254,4 cm<sup>2</sup>, lecho= 36 cm, volumen empaquetado= 9,16 ± 0,25 l.

65 La columna se desinfecta con de 1,5 a 2,5 CV de NaOH 1M + NaCl 2M con un tiempo de contacto de 2 horas a un caudal de 40 l/hora (157 cm/h). El caudal máximo puede ser de 250 cm/h. El pH se estabiliza con de 1 a 2,5 CV de

acetato amónico 50 mM + NaCl 2M a pH, 2,0. Después, la columna se equilibra con de 4 a 5,5 CV de acetato amónico 50 mM a pH, 2,0.

5 El pH de la fracción QSFF-FT (véase la sección 2) se ajusta a 2,0 con 37 % de HCl. Esta solución se carga sin dilución previa a un caudal de 125 cm/h ( $\pm 31,8$  l/h). La capacidad de unión del gel es de 5 a 15 mg/ml de la matriz. Después de cargar, la columna se equilibra con de 2 a 3 CV de de acetato amónico 50 mM a pH, 2,0, a un caudal de 157 cm/h (40 l/h). Caudal máximo es de 200 cm/min.

10 La elución se realiza con un gradiente lineal de conductividad en 10 CV entre 25 % (NaCl 0,5M) y 75 % (NaCl 1,5M) con acetato amónico 50 mM a pH 2,0 y acetato amónico 50 mM + NaCl 2M a pH, 2. La elución se realiza a un caudal de 157 cm/h (40 l/h). El caudal máximo es 200 cm/h. El pico eluido se recoge en fracciones de 2 litros, que se analizarán mediante SDS-PAGE antes de agrupar. Después de combinar, la combinación de MHS-E se almacena a  $-20$  °C hasta la siguiente etapa de purificación o a  $2-8^{\circ}\text{C}$  si se usa en un plazo de 24 horas.

15 Después, la columna de desinfecta con de 1,5 a 2,5 CV de NaOH 1M + NaCl 2M (2 horas) y se almacena a temperatura ambiente en NaOH 20 mM.

#### 4. Concentración – Diafiltración

20 La concentración se realiza con dos casete Sartocoon ( $0,6\text{ m}^2$ , corte en 5 kDa) con membranas de Hydrosart Sartorius (Sartopore nº cat. 302 144 2906 E-SG). Las membranas se montan en un soporte conectado a un sistema Proflux M12 (Millipore Bioprocess Division). La membrana se aclara con agua para inyección (WFI). La desinfección se realiza mediante recirculación continua de NaOH 0,5M durante 60 minutos. Después, la membrana se aclara con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  20mM pH 7,0, hasta un pH permeado  $=7,0 \pm 0,1$ . Después, la membrana se equilibra con PBS a pH 7,4 (NaCl 8 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,19 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,38 g/l) hasta un pH permeado  $=7,4 \pm 0,1$ .

La presión de entrada y las presiones de salida se fijan a  $150 \pm 10$  kPa y a  $120 \pm 10$  kPa, respectivamente.

30 Los diversos eluatos de Macroprep High S se juntan y, de acuerdo con la cantidad total de proteína, se concentran hasta un volumen correspondiente a una concentración teórica de 30 mg/ml. Tras la concentración, la parte retenida se somete a diafiltración contra 10 volúmenes de PBS a PH, 7,4 (NaCl 8 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,19 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,38 g/l). La parte retenida se recoge y se llevan a cabo 7 lavados de la membrana, cada uno con 150 ml de PBS a pH 7,4 (NaCl 8 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,19 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,38 g/l) durante 3 minutos con los mismos parámetros de procesamiento. La línea permeada se cierra durante los lavados.

35 Se lleva a cabo un ensayo de la proteína BCA sobre la parte retenida y cada fracción de lavado separada. La parte retenida se combina con fracciones de lavado seleccionadas para obtener una concentración total superior a 12 mg/ml con un rendimiento superior hasta el 90 %, si es posible.

40 La membrana se aclara con WFI. La desinfección se realiza mediante recirculación continua de NaOH 0,5M durante 60 minutos. Después, la membrana se almacena en NaOH 0,1M.

#### 5. Esterilización por filtración

45 La esterilización mediante filtración de la parte retenida + las fracciones de lavado seleccionadas se realiza en un filtro Sartopore 2 de  $1000\text{ cm}^2$  0,45/0,22 (Sartorius, nº cat. 544-1307-H8-00) a temperatura ambiente. La membrana se aclara con aproximadamente 500 ml de PBS a pH 7,4 (NaCl 8 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,19 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,38 g/l) antes de usar.

50 La filtración se realiza con una bomba peristáltica a un caudal de aproximadamente 100 ml/min y el filtrado se recoge en botellas de un solo uso estériles y apirógenas de 5 l o 10 l.

55 De acuerdo con un ensayo de BCA realizado sobre el volumen filtrado, la concentración se ajusta hasta 10 mg/ml con PBS a Ph 7,4 (NaCl 8 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,19 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,38 g/l) añadido mediante filtración. Después de la obtención de la muestra, el volumen estéril se alícuota en frascos Nalgene de 2000 ml de PETG ( $\pm 1500$  ml a 1700 ml / frascos). El volumen estéril se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En la Figura 1 de proporciona un resumen esquemático de las etapas de producción.

#### Ejemplo 4: Eficiencia de la purificación de hH1.3 y bis-met hH1.3

60 El cultivo de BL21[DE3]-bis-met rH1.3 en un fermentador de 50 l tuvo como resultado un rendimiento al tiempo de recolección de al menos 600 mg/l de cultivo, evaluado mediante análisis SDS-PAGE en una dilución en serie de células lisadas totales. El rendimiento final tras el proceso de purificación completa fue un exceso de 500 mg/l de bis-met rH13 purificada.

65 El cultivo de BL21[DE3]-hH1.3 en un fermentador de 50 l tuvo como resultado un rendimiento al tiempo de

recolección de al menos 600 mg/l de cultivo, evaluado mediante análisis SDS-PAGE en una dilución en serie de células lisadas totales. Las células se procesaron mediante homogeneización y precipitación con HClO<sub>4</sub> de acuerdo con el protocolo estándar. Los resultados obtenidos estaban de acuerdo con las expectativas. La carga en el MacroPrep High-S también se realizó de la forma habitual, no obstante, la proteína rhH1.3 no se pudo eluir de la columna usando el gradiente lineal de conductividad en 10 CV entre 30 % (NaCl 0,6M) y 75 % (1,5 M, Na Cl) con NaCH<sub>3</sub>COO 10 mM a pH 2,0 y NaCH<sub>3</sub>COO 10 mM + NaCl 2M a pH 2,0. Aunque la proteína rhH1.3 eluyó a NaCl 2M, esta etapa no permitió una suficiente purificación y la proteína no se pudo procesar. Por tanto, la purificación se considerará con fracaso. Ese fallo se confirmó en dos ensayos de purificación independientes hechos de dos fermentaciones diferentes.

### **Ejemplo 5: Efecto de la bis-met histona H1.3 in vitro**

#### **Ensayo de la zona de inhibición**

Para medir el efecto de la histona recombinante como agente antimicrobiano y antiviral se realizó un ensayo de la zona de inhibición de acuerdo con procedimientos estándar. Además, se analizó el efecto de la histona recombinante como agente antifúngico. Las bacterias y hongos se cultivaron en presencia de la bis-met histona H1.3 producida de acuerdo con los procedimientos indicados anteriormente y se determinó el diámetro medio de la zona (véase la tabla 1).

Tanto las bacterias gran positivas como gran negativas y hongos se eliminan con eficacia tal como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: **Ensayo de la zona de inhibición**

Organismo analizado	Concentración del fármaco [µg/ml]	Diámetro medio de la zona. [mm]
Bacillus megaterium	5	11,4
	2,5	10,5
	1,25	9,7
	0,625	8,6
	0,31	7,9
	Control positivo LL37	9,8
Escherichia coli D21	20,00	7,4
	10,00	6,3
	5,00	4,8
	2,5	0
	1,25	0
	Control positivo LL37	5
Candida albicans	20,00	11,8
	5,00	8,1
	2,5	6,1
	1,25	4,4
	Control positivo: nistatina	20,9

#### **Ensayo de citotoxicidad:**

Este ensayo celular es para detectar el efecto tóxico de la histona sobre una línea celular de leucemia sensible a histonas (p. ej. U-937). La vitalidad de las células cancerosas de leucemia tras la incubación a diferentes concentraciones de histona se monitoriza por medio del ensayo AlamarBlue, basado en la observación de la fluorescencia del indicador redox, que cambia en respuesta a la vitalidad de la célula. La actividad anticancerosa de las histonas se caracteriza por la CI50, que corresponde a la concentración de histona por la que se observó el 50 % de la viabilidad de las células cancerosas. Los lotes usados para el ensayo de citotoxicidad, así como los ensayos clínicos se resumen en la tabla 2. Como se muestra en la Tabla 1, todas las muestras analizadas muestran una citotoxicidad similar alta contra la línea de células tumorales U-037, con independencia de los diferentes contenidos de of H1.3 y bis-Met (cf. Tabla 3).

**Tabla 2: Citotoxicidad de los lotes usados en el ensayo clínico:**

Muestras (producto farmacológico)	CI <sub>50</sub> [μM]
Lote 1: M-H1A-P02	3,2 ± 0,5
Lote 2: M-H1A-Pool01	3,1 ± 0,5
Lote 3: M-H1A-Pool02	3,1 ± 0,5
Lote 4: M-H1A-Pool03	2,2 ± 0,5

Además de las bacterias y los hongos que se muestran en la tabla 1, oras bacterias, hongos y virus se pueden analizar convenientemente mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como cualquiera de los procedimientos indicados en el presente documento. Ejemplos no limitantes incluyen el virus de Epstein-Barr, Staphylococcus aureus, Aspergillus niger, Enterococcus, Pseudomonas, Haemophilus influenzae y Salmonella.

**Ejemplo 6: Datos clínicos**

Se llevó a cabo un ensayo de fase I/II de escalada de dosis para evaluar la dosis máxima tolerable (DMT) de la histona humana recombinante H1.3 (rhH1.3) en pacientes con LMA recurrente o resistente y en pacientes que han rechazado la quimioterapia o que no son aptos para recibir quimioterapia. Los criterios de inclusión de los pacientes fueron: Consentimiento informado firmado, cualquier raza, ambos sexos, tener al menos 18 años de edad, LMA confirmada mitológicamente con al menos un 20 % de blastos en la médula ósea, fracaso de la quimioterapia convencional, no apto para ella o haberla rechazado, estado funcional adecuado (índice de Karnowsky > 60 5) y una esperanza de vida de al menos 30 días. Los criterios que conducen a la exclusión de pacientes fueron deficiencia orgánica significativa, infección conocida por el VIH, infección conocida por el virus de la hepatitis C o por el virus de la hepatitis B, embarazo o lactancia, otras neoplasias malignas, anticuerpos anti-H1 circulantes, tratamiento con heparina durante las dos semanas anteriores a la visita 1 o durante la participación en el estudio, afecciones médicas activas conocidas que posiblemente interfirieran en el tratamiento con rhH1.3, tal como artritis reumatoide o lupus eritematosos sistémico (LE), así como alcoholismo y/o drogadicción.

**Diseño del estudio**

Los pacientes recibieron 3 infusiones a la semana durante tres semanas consecutivas. La dosis inicial fue de 38 mg/m<sup>2</sup>. En la tabla 3 se muestra el esquema de escalado de dosis usado.

**Tabla 3: Esquema de escalado de la dosis:**

Niveles de dosis	Dosis en mg/m <sup>2</sup>	Número pacientes programado	Analizados	Tratamiento
1	38	3	7	Completo
2	60	3	7	Completo
3	96	3	3	Completo
4	153	3	3	Completo
Nueva escalada de dosis				
5, 5, 6	245, 245, 392	1 (ciclo 1)	1	Completo
6, 6, 7	392, 392, 628	(ciclo 2, el mismo paciente que antes)		Completo
6, 6, 7	392, 392, 628	1	1	Completo

El ensayo clínico de fase I/II se realizó en el Saarland University Hospital de Homburg con pacientes con LMA (leucemia mieloide aguda). Los lotes de fármaco usados en este ensayo fueron: B1, B2, B3 y B4. Las características de estos cuatro lotes y un lote de GLP, usado en el estudio de toxicología, se presenta en la tabla 4 que figura a continuación:

**Tabla 4: Características de los lotes de polipéptido usados en el estudio**

Lotes:	Descripción	endotoxina [UE/mg]	Evaluación-Nivel de endotoxina	Picos EM de rh H1.3 [Da]	Actividad antitumoral en el ensayo celular, CI <sub>50</sub> [μM]
L-H1A-03B07*		5	Por debajo del LA	H1.3 + bis Met	1,7 - 2,7

M-H1A-P02	B1	12	por encima del LA	H1.3 + bis Met	3,2
M-H1A-Pool01	B2	95	por encima del LA	Principalmente bis Met	3,1
M-H1A-Pool02	B3	0,8	Por debajo del LA	Principalmente bis Met	3,1
M-H1A-Pool03	B4	1,7	Por debajo del LA	Principalmente bis Met	2,2

Usado en el estudio de toxicología, no en el ensayo clínico

LA: límite de aceptación

Picos de EM: 22221 Da H1.3 Sin Met  
22481 Da bis Met Met-Met en el extremo N

5 6.1 Evaluación preliminar

La tabla 5 resume los resultados clínicos preliminares de los primeros 22 pacientes de LMA tratados con la histona humana recombinante H1.3 (rh H1.3, "Oncohist") a niveles de dosis crecientes (el denominado esquema de Fibonacci).

10 Los pacientes WW13 y WW27 recibieron dos ciclos de tratamiento cada uno (un ciclo compuesto por 3 infusiones a la semana durante tres semanas, en total 9). WW27 presentó una escalada de la dosis en cada ciclo, es decir 5-5-6: Dos semanas con el nivel de dosis 5, tercera semana nivel de dosis 6, y, de forma similar, en el segundo ciclo niveles de dosis: 6-6-7.

15 **Tabla 5: Resultados clínicos de los pacientes con LMA tratados con la histona recombinante humana H1.3 ("Oncohist") obtenidos en la evaluación preliminar.**

Iniciales y N° del paciente & No	Niveles de dosis	Observaciones	Lote del producto farmacológico	Composición de acuerdo con EM (H1.3, bis Met)*	Contaminación con endotoxina [UE/mg]	Efectos secundarios
AS 01	1	ITT	B1	H1.3 + bis Met	12	Moderadamente tolerados
NM 02	1	ITT	B1	H1.3 + bis Met		Mal tolerados
HS 03	1	ITL	B1	H1.3 + bis Met		Bien tolerados
RH 04	1	ITT	B1	H1.3 + bis Met		Bien tolerados
MF 05	1	ITT, ITL	B1	H1.3 + bis Met		Mal tolerados
RS 07		ITT	B1	H1.3 + bis Met		Bien tolerados
			Viales B1 – 21			
PS 10	1	ITT	Viales B2 – 4	H1.3 + bis Met		Bien tolerados
MT 11	2		B2	Principalmente bis Met	95	Mal tolerados
MG 12	2	ITL	B2	Principalmente bis Met		Mal tolerados
WW 13	2	RP, TN	B2	Principalmente bis Met		Mal tolerados
AH 15	2	ITT, ITL	B2	Principalmente bis Met		Mal tolerados
GB 16	2	TN, ITL	B2	Principalmente bis Met		Mal tolerados
HF 18	2	ITT, ITL	B2	Principalmente bis Met		Mal tolerados

Iniciales y N° del paciente & No	Niveles de dosis	Observaciones	Lote del producto farmacológico	Composición de acuerdo con EM (H1.3, bis Met)*	Contaminación con endotoxina [UE/mg]	Efectos secundarios
Inicio del fármaco histona sin endotoxina						
		RP, ITT,				
ES 19	2	ITL	B3	Principalmente bis Met	0,8	SES
IG 20	3		B3	Principalmente bis Met		SES
BG 21	3	ITT	B3	Principalmente bis Met		SES
GR 22	3		B3	Principalmente bis Met		
EL 23	4	ITT, ITL	B3	Principalmente bis Met		SES
EW 24	4		B3	Principalmente bis Met		SES
BH 26	4		B3	Principalmente bis Met		SES
	C1:					
	5, 5, 6					
	C2:					
WW 27	6, 6, 7	RP, ITT	B3/B4	Principalmente bis Met	B4: 1,7	SES
PF 28	6, 6, 7		B3	Principalmente bis Met		

Análisis preliminar:

RP: remisión parcial

ITT: Incremento temporal de los trombocitos

5 TN: Trombocitos con niveles normales

ITL: Incremento temporal de los leucocitos

SES: sin efectos secundarios

H1.3: Histona H1.3 recombinante humana madura; bis-Met: N-Met-Met-H1.3

10 Como será evidente a partir de la Tabla 5, los efectos secundarios farmacológicos sólo se producen como consecuencia de la contaminación por endotoxina (véase también la Tabla 3). Tanto la histona H1.3 natural como el derivado "bis Met" muestran propiedades similares en lo que respecta a los signos clínicos de eficacia.

**Inmunogenicidad**

15 Con todos los pacientes se realizó detección selectiva para detectar la presencia de autoanticuerpos anti-histona H1.3. antes, durante y después del tratamiento. Ninguno de los pacientes tratados desarrolló autoanticuerpos durante el tratamiento, ni tampoco aquéllos con un ciclo de tratamiento ni aquéllos que recibieron dos ciclos. La histona H1 es una proteína de evolución altamente conservadora y no se espera ni se ha demostrado que sea  
20 inmunogénica. Los datos clínicos confirman que no se puede observar actividad inmunogénica usando la histona natural H1.3 ni el derivado "bis Met".

**Efectos terapéuticos**

25 Aproximadamente el 50 % de los pacientes mostró un incremento de los trombocitos y parte de ellos también un incremento de leucocitos, ambos biomarcadores muy importantes de la LMA. Tres pacientes presentaron remisión parcial (disminución de las células tumorales a menos del 50 % del valor inicia. El paciente WW13 mostró un incremento de trombocitos a niveles normales ( $210 \times 10^9/l$ ), que duró 18 meses. El recuento de His trombocitos antes del tratamiento con Oncohist fue igual a  $47 \times 10^9/l$ .

30 6.2 Evaluación final de los resultados clínicos

35 La tabla 6 resume los resultados clínicos obtenidos después de un análisis más detallado de los 22 pacientes de LMA tratados con la histona humana recombinante H1.3 (rh H1.3, "Oncohist") a niveles de dosis crecientes (esquema de Fibonacci).

40 Como se ha descrito anteriormente, los pacientes WW13 y WW27 habían recibido dos ciclos de tratamiento cada uno (un ciclo compuesto por 3 infusiones a la semana durante tres semanas, en total 9). WW27 había sufrido una escalada de la dosis en cada ciclo, es decir 5-5-6: dos semanas con el nivel de dosis 5, tercera semana nivel de dosis 6, y, de forma similar, en el segundo ciclo niveles de dosis: 6-6-7.

Tabla 6: Resultados clínicos de los pacientes con LMA tratados con la histona recombinante humana H1.3 ("Oncohist") en la evaluación final.

Iniciales y N° del paciente	Niveles de dosis	Observaciones	Lote del producto farmacológico	Composición de acuerdo con EM (H1.3, bisMet)*	Contaminación Con endotoxina [UE/mg]	Efectos secundarios
AS 01			B1	H1.3 + bis Met	12	Moderadamente tolerados
NM 02		IT, IL	B1	H1.3 + bis Met		Mal tolerados
HS 03		ITL	B1	H1.3 + bis Met		Moderadamente tolerados
RH 04			B1	H1.3 + bis Met		Bien tolerados
MF 05			B1	H1.3 + bis Met		Mal tolerados
RS 07			B1	H1.3 + bis Met		Bien tolerados
			Viales B1 - 21			
PS 10	1		Viales B2 - 4	H13 + bis Met		Bien tolerados
MT 11	2		B2	Principalmente bis Met	95	Mal tolerados
MG 12	2	IL	B2	Principalmente bis Met		Mal tolerados
WW 13	2	RP, TN	B2	Principalmente bis Met		Mal tolerados
AH 15	2	IL	B2	Principalmente bis Met		Mal tolerados
GB 16	2		B2	Principalmente bis Met		Mal tolerados
HF 18	2		B2	Principalmente bis Met		Mal tolerados
			Inicio del fármaco histona sin endotoxina			
ES 19	2	RP, IT,	B3	Principalmente bis Met	0,8	Bien tolerados
IG 20	3		B3	Principalmente bis Met		Bien tolerados
BG 21	3	IT	B3	Principalmente bis Met		Bien tolerados
GR 22	4		B3	Principalmente bis Met		
EL 23	4	IT <sup>b</sup> , IL	B3	Principalmente bis Met		Bien tolerados
EW 24	4		B3	Principalmente bis Met		Bien tolerados
BH 26			B3	Principalmente bis Met		Bien tolerados
	C1: 5, 5, 6;	RP, IT,				
WW 27	C2: 6, 6, 7	IL	B3/B4	Principalmente bis Met	B4: 1,7	Bien tolerados Día 8**, día 19
PF 28	6, 6, 7		B3	Principalmente bis Met		AAG***

- 5 \*Análisis preliminar  
 \*\*AA tras una de las 9 infusiones, recuperado  
 \*\*\* AAG durante la última infusión, fibrilación auricular en un paciente de 74 años, relación cuestionable  
 RP: remisión parcial  
 IT: Incremento de trombocitos
- 10 TN. Trombocitos con niveles normales  
 IL: Incremento de leucocitos  
 AA: Acontecimientos adversos, AAG: acontecimientos adversos graves  
 H1.3: Histona H1.3 recombinante humana madura; bis-Met: N-Met-Met-H1.3



**Efectos terapéuticos**

De acuerdo con la evaluación final, siete de los 22 pacientes mostraron un incremento de los trombocitos y parte de ellos también un incremento de leucocitos, ambos biomarcadores muy importantes de la LMA. Tres pacientes presentaron remisión parcial (disminución de las células tumorales a menos de 6-25 % con mejora concomitante de otros valores sanguíneos); el paciente WW13 mostró un incremento de los trombocitos a niveles normales ( $210 \times 10^9/l$ ) que duró 18 meses. El recuento de His trombocitos antes del tratamiento con Oncohist fue igual a  $47 \times 10^9/l$ .

**Evaluación de seguridad**

En un informe de estudio clínico se mostró que rhH1.3 (Oncohist) era segura a las dosis usadas hasta ahora. No se observaron efectos secundarios graves, a excepción de una fibrilación auricular con la infusión de rhH1.3, que se consideró posiblemente relacionada con el fármaco del estudio. Diecisiete (17) pacientes completaron un ciclo de terapia (8-9 administraciones) y dos pacientes respondedores recibieron un segundo ciclo sin efectos secundarios. No se observaron toxicidades limitantes de la dosis y la dosis máxima tolerada no se ha alcanzado a  $628 \text{ mg/m}^2$ .

Todavía más importante, el fármaco del estudio sin endotoxinas fue bien tolerado por los pacientes, es decir sin efectos secundarios, al contrario que los citostáticos. Este resultado es compatible con los estudios preclínicos, que muestran que el derivado de la histona H1.3 recombinante humana no daña las células sanguíneas sanas y no produce resistencia.

**Ejemplo 7: Evaluación de la presencia de bis-met hH1.3 en una muestra**

La histona hH1.3 "bis-Met" se puede distinguir fácilmente mediante EM de la histona endógena H1. Esto se puede analizar directamente con detección ESI-QTOF de la solución farmacológica rhH1.3 original sin procesar o en un procedimiento RP-HPLC-ESI-MS con separación cromatográfica mediante RP-HPLC y la posterior detección con ESI-EM. Como se puede observar en la Figura 2, el lote B1 contiene la histona H1.3 y el derivado N-Met-Met. La Figura 3 muestra uno de los tres lotes (B2), que consiste principalmente en N-Met-Met-H1.3. Con independencia de la composición, los diferentes lotes muestran actividad citotóxica comparable contra las células de leucemia (Tabla 3).

Los espectros siguientes s estuvieron mediante espectrometría de masas tándem (QTOF, una combinación de espectrometría cuadrupoles y tiempo de vuelo en un único instrumento). Como se puede observar en la Figura 2, el lote B1 contiene la histona H1.3 y el derivado N-Met-Met. La Figura 3 muestra uno de los tres lotes (B2), que consiste principalmente en N-Met-Met-H1.3. Con independencia de la composición, los diferentes lotes muestran actividad citotóxica comparable contra las células de leucemia (Tabla 3).

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 5 <110> SymbioTec Gesellschaft zur Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der Biotechnologie mbH  
Thiry, Michel
- <120> Histonas bis-met
- 10 <130> N1720 PCT
- <150> EP 07 00 7200.4  
<151> 05/04/2007
- 15 <150> EP 07 01 8956.8  
<151> 26/09/2007
- <160> 13
- 20 <170> Patentin versión 3.3
- <210> 1  
<211> 220  
<212> PRT
- 25 <213> homo sapiens
- <400> 1

ES 2 372 998 T3

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

5 <210> 2  
 <211> 678  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <221> Fuente  
 <223> Nota= "Descripción de la secuencia artificial: Histona bis-met rHI.3"

15 <400> 2

ES 2 372 998 T3

```

tcattgatgtc cgaaacccgct ccgctggctc cgaccatccc ggctccggct gaaaaaaccc      60
cggttaagaa aaaggctaaa aaagctggtg ctaccgctgg taaacgtaaa gcttccggtc      120
cgccggtttc cgaactgatc accaaagctg ttgctgcttc caaagaacgt tccggtgttt      180
ccctggctgc tctgaaaaaa gctctggctg ctgctgggta cgacgttgag aaaaacaact      240
cccgtatcaa actgggtctg aaatccctgg tttccaaagg caccctggtt cagaccaaag      300
gcaccgggtc ttccggttcc ttcaaactga acaaaaaagc tgcttccggt gaaggtaaac      360
cgaaagctaa gaaagcgggt gcggctaaac cgcgtaaac ggctggtgct gctaaaaaac      420
cgaaaaaagt tgctggtgct gctaccccgga aaaaatccat caagaaaacc ccgaaaaaag      480
ttaaaaaacc ggctaccgct gctggcacca aaaaagttgc taaatccgct aaaaagtta      540
aaaccccgca gccgaaaaaa gctgctaaat ccccggtctaa agctaaagct ccgaaaccga      600
aagctgctaa accgaaatcc ggtaaaccga aagttaccaa agctaaaaag gctgctccga      660
aaaagaaata atggatcc                                     678
    
```

<210> 3

<211> 222

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Fuente

10 <223> Nota= "Descripción de la secuencia artificial: Histona bis-met rH1.3"

<400> 3

```

Met Met Ser Glu Thr Ala Pro Leu Ala Pro Thr Ile Pro Ala Pro Ala
 1          5          10          15
    
```

```

Glu Lys Thr Pro Val Lys Lys Lys Ala Lys Lys Ala Gly Ala Thr Ala
          20          25          30
    
```

ES 2 372 998 T3

Gly Lys Arg Lys Ala Ser Gly Pro Pro Val Ser Glu Leu Ile Thr Lys  
 35 40 45  
 Ala Val Ala Ala Ser Lys Glu Arg Ser Gly Val Ser Leu Ala Ala Leu  
 50 55 60  
 Lys Lys Ala Leu Ala Ala Ala Gly Tyr Asp Val Glu Lys Asn Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Arg Ile Lys Leu Gly Leu Lys Ser Leu Val Ser Lys Gly Thr Leu Val  
 85 90 95  
 Gln Thr Lys Gly Thr Gly Ala Ser Gly Ser Phe Lys Leu Asn Lys Lys  
 100 105 110  
 Ala Ala Ser Gly Glu Gly Lys Pro Lys Ala Lys Lys Ala Gly Ala Ala  
 115 120 125  
 Lys Pro Arg Lys Pro Ala Gly Ala Ala Lys Lys Pro Lys Lys Val Ala  
 130 135 140  
 Gly Ala Ala Thr Pro Lys Lys Ser Ile Lys Lys Thr Pro Lys Lys Val  
 145 150 155 160  
 Lys Lys Pro Ala Thr Ala Ala Gly Thr Lys Lys Val Ala Lys Ser Ala  
 165 170 175  
 Lys Lys Val Lys Thr Pro Gln Pro Lys Lys Ala Ala Lys Ser Pro Ala  
 180 185 190  
 Lys Ala Lys Ala Pro Lys Pro Lys Ala Ala Lys Pro Lys Ser Gly Lys  
 195 200 205  
 Pro Lys Val Thr Lys Ala Lys Lys Ala Ala Pro Lys Lys Lys  
 210 215 220

- <210> 4
- <211> 675
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> Fuente
- 10 <223> Nota= "Descripción de la secuencia artificial: histona rH1.3"
- <400> 4

tcattgagcga aaccgcgccg ctggcgccga ccattccggc gccggcggaa aaaaccccgg 60  
 ttaaaaaaaaa agcgaaaaaa gccggtgcga ccgcgggtaa acgtaaagcg agcgggtccgc 120  
 cggttagcga actgattacc aaagcgggtg cggcgagcaa agaacgtagc ggtgtagcc 180  
 tggcggcgct gaaaaaagcg ctggcggcgg cgggttatga tgtggaaaaa aacaacagcc 240  
 gcatcaaaact gggctctgaaa agcctgggta gcaaaggcac cctggttcag accaaaggca 300

ES 2 372 998 T3

ccggtgtagcggcg cggtagcttt aaactgaaca aaaaagcggc gagcggtgaa ggtaaaccga 360  
 aagccaaaaa agcggggcgcg gcgaaaccgc gtaaaccggc gggtagcggcg aaaaaaccga 420  
 aaaaagttgc gggtagcggcc accccgaaaa aaagcatcaa aaaaaccccg aaaaagtga 480  
 aaaaaccggc caccgcggcg ggcacaaaaa aagtggcgaa aagcgcgaaa aaagttaaaa 540  
 ccccgtagcc gaaaaagcg gccaaaagcc cggcgaaagc gaaagcggc aaaccgaaag 600  
 cggccaaacc gaaaagcggg aaaccgaaag ttaccaaagc gaaaaagcg gcgccgaaaa 660  
 aaaaataatg gatcc 675

<210> 5  
 <211> 221  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> Fuente

10 <223> nota="Descripción de la secuencia artificial: Histona rH1.3"

<400> 5

Met Ser Glu Thr Ala Pro Leu Ala Pro Thr Ile Pro Ala Pro Ala Glu  
 1 5 10 15  
 Lys Thr Pro Val Lys Lys Lys Ala Lys Lys Ala Gly Ala Thr Ala Gly  
 20 25 30  
 Lys Arg Lys Ala Ser Gly Pro Pro Val Ser Glu Leu Ile Thr Lys Ala  
 35 40 45  
 Val Ala Ala Ser Lys Glu Arg Ser Gly Val Ser Leu Ala Ala Leu Lys  
 50 55 60  
 Lys Ala Leu Ala Ala Ala Gly Tyr Asp Val Glu Lys Asn Asn Ser Arg  
 65 70 75 80  
 Ile Lys Leu Gly Leu Lys Ser Leu Val Ser Lys Gly Thr Leu Val Gln  
 85 90 95  
 Thr Lys Gly Thr Gly Ala Ser Gly Ser Phe Lys Leu Asn Lys Lys Ala  
 100 105 110  
 Ala Ser Gly Glu Gly Lys Pro Lys Ala Lys Lys Ala Gly Ala Ala Lys  
 115 120 125  
 Pro Arg Lys Pro Ala Gly Ala Ala Lys Lys Pro Lys Lys Val Ala Gly  
 130 135 140  
 Ala Ala Thr Pro Lys Lys Ser Ile Lys Lys Thr Pro Lys Lys Val Lys  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Ala Thr Ala Ala Gly Thr Lys Lys Val Ala Lys Ser Ala Lys  
 4

ES 2 372 998 T3

165
170
175

Lys Val Lys Thr Pro Gln Pro Lys Lys Ala Ala Lys Ser Pro Ala Lys  
180
185
190

Ala Lys Ala Pro Lys Pro Lys Ala Ala Lys Pro Lys Ser Gly Lys Pro  
195
200
205

Lys Val Thr Lys Ala Lys Lys Ala Ala Pro Lys Lys Lys  
210
215
220

5 <210> 6  
 <211> 642  
 <212>ADN  
 <213> homo sapiens

<400> 6

	atgtccgaga ctgctcctgc cgctcccgt gccgcgcctc ctgcggagaa ggcccctgta	60
	aagaagaagg cggccaaaaa ggctgggggt acgcctcgta aggcgtccgg tcccccggtg	120
	tcagagctca tcaccaaggc tgtggccgcc tctaaagagc gtagcggagt ttctctggct	180
	gctctgaaaa aagcgttggc tgccgccggc tatgatgtgg agaaaaaca cagccgtatc	240
	aaacttggtc tcaagagcct ggtgagcaag ggcactctgg tgcaaacgaa aggcaccggt	300
	gcttctggct cttttaaact caacaagaag gcagcctccg gggaagccaa gcccaaggtt	360
	aaaaaggcgg gcggaaccaa acctaagaag ccagttgggg cagccaagaa gcccaagaag	420
	gcggctggcg gcgcaactcc gaagaagagc gctaagaaaa caccgaagaa agcgaagaag	480
	ccggccgcgg cactgtaac caagaaagtg gctaagagcc caaagaaggc caaggttgcg	540
	aagccaaga aagctgcaa aagtgctgct aaggctgtga agccaaggc cgctaagccc	600
10	aaggttgca agcctaagaa ggcggcgccc aagaagaaat ag	642

15 <210> 7  
 <211>213  
 <212>PRT  
 <213> homo sapiens

<400> 7

ES 2 372 998 T3

Met Ser Glu Thr Ala Pro Ala Ala Pro Ala Ala Ala Pro Pro Ala Glu  
 1 5 10 15

Lys Ala Pro Val Lys Lys Lys Ala Ala Lys Lys Ala Gly Gly Thr Pro  
 20 25 30

Arg Lys Ala Ser Gly Pro Pro Val Ser Glu Leu Ile Thr Lys Ala Val  
 35 40 45

Ala Ala Ser Lys Glu Arg Ser Gly Val Ser Leu Ala Ala Leu Lys Lys  
 50 55 60

Ala Leu Ala Ala Ala Gly Tyr Asp Val Glu Lys Asn Asn Ser Arg Ile  
 5

65 70 75 80

Lys Leu Gly Leu Lys Ser Leu Val Ser Lys Gly Thr Leu Val Gln Thr  
 85 90 95

Lys Gly Thr Gly Ala Ser Gly Ser Phe Lys Leu Asn Lys Lys Ala Ala  
 100 105 110

Ser Gly Glu Ala Lys Pro Lys Val Lys Lys Ala Gly Gly Thr Lys Pro  
 115 120 125

Lys Lys Pro Val Gly Ala Ala Lys Lys Pro Lys Lys Ala Ala Gly Gly  
 130 135 140

Ala Thr Pro Lys Lys Ser Ala Lys Lys Thr Pro Lys Lys Ala Lys Lys  
 145 150 155 160

Pro Ala Ala Ala Thr Val Thr Lys Lys Val Ala Lys Ser Pro Lys Lys  
 165 170 175

Ala Lys Val Ala Lys Pro Lys Lys Ala Ala Lys Ser Ala Ala Lys Ala  
 180 185 190

Val Lys Pro Lys Ala Ala Lys Pro Lys Val Val Lys Pro Lys Lys Ala  
 195 200 205

Ala Pro Lys Lys Lys  
 210

5 <210> 8  
 <211> 666  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

10 <400> 8



ES 2 372 998 T3

```

atgtcggaga ctgctccact tgctcctacc attcctgcac cgcagaaaa aacacctgtg      60
aagaaaaagg cgaagaaggc aggcgcaact gctgggaaac gcaaagcatc cggaccccca      120
gtatctgagc ttatcaccaa ggcagtggca gcttctaagg agcgcagcgg cgtttctctg      180
gccgcgctta agaaagcgct tgcggctgct ggctacgatg tagaaaaaaaa caacagccgt      240
atcaagcttg gcctcaagag cttggtgagc aaaggtactc tgggtcagac caaaggtacc      300
ggtgcttctg gtccttcaa actcaacaag aaagcggctt ccggggaagg caaacccaag      360
gccaaaaagg ctggcgcagc caagcctagg aagcctgctg gggcagccaa gaagcccaag      420
aaggtggctg gcgccgtac cccgaagaaa agcatcaaaa agactcctaa gaaggtaaag      480
aagccagcaa ccgctgctgg gaccaagaaa gtggccaaga gtgcgaaaaa ggtgaaaaca      540
cctcagccaa aaaaagctgc caagagtcca gctaaggcca aagcccctaa gcccaaggcg      600
gccaaagccta agtcggggaa gccgaaggtt acaaaggcaa agaaggcagc tccgaagaaa      660
aagtga

```

<210> 9  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
  
 <400> 9

5

ES 2 372 998 T3

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

<210> 10  
 <211> 660  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

5

<400> 10

atgtccgaga ctgcgctgc cgcgcccgt gtcctggccc ctgccgagaa gactccccgtg 60  
 aagaagaagg cccgcaagtc tgcaggtgcg gccaaagcga aagcgtctgg gccccgggtg 120  
 tccgagctca ttactaaagc tgttgccgcc tccaaggagc gcagcggcgt atctttggcc 180  
 gctctcaaga aagcgtggc agccgctggc tatgacgtgg agaaaaaca cagccgcatc 240  
 aagctgggtc tcaagagcct ggtgagcaag ggcaccctgg tgcagaccaa gggcaccggc 300  
 gcgtcgggtt cttcaaaact caacaagaag gcggcctctg ggaagccaa gcctaaggct 360  
 aaaaaggcag gcgcgcccaa ggccaagaag ccagcaggag cggcgaagaa gcccaagaag 420  
 gcgacggggg cggccacccc caagaagagc gccaaagaaga ccccaaagaa ggcgaagaag 480  
 ccggctgcag ctgctggagc caaaaaagcg aaaagcccga aaaaggcgaa agcagccaag 540  
 ccaaaaaagg cgccaagag cccagcgaag gccaaagcag ttaaacccea ggcggctaaa 600  
 ccaaagaccg ccaagcccaa ggcagccaag ccaagaagg cggcagccaa gaaaaagtag 660

<210> 11  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

<400> 11

Met Ser Glu Thr Ala Pro Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Glu  
 1 5 10 15  
 Lys Thr Pro Val Lys Lys Lys Ala Arg Lys Ser Ala Gly Ala Ala Lys  
 20 25 30  
 Arg Lys Ala Ser Gly Pro Pro Val Ser Glu Leu Ile Thr Lys Ala Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Ser Lys Glu Arg Ser Gly Val Ser Leu Ala Ala Leu Lys Lys  
 50 55 60  
 Ala Leu Ala Ala Ala Gly Tyr Asp Val Glu Lys Asn Asn Ser Arg Ile  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Gly Leu Lys Ser Leu Val Ser Lys Gly Thr Leu Val Gln Thr  
 85 90 95  
 Lys Gly Thr Gly Ala Ser Gly Ser Phe Lys Leu Asn Lys Lys Ala Ala  
 100 105 110  
 Ser Gly Glu Ala Lys Pro Lys Ala Lys Lys Ala Gly Ala Ala Lys Ala  
 115 120 125  
 Lys Lys Pro Ala Gly Ala Ala Lys Lys Pro Lys Lys Ala Thr Gly Ala  
 130 135 140

Ala Thr Pro Lys Lys Ser Ala Lys Lys Thr Pro Lys Lys Ala Lys Lys  
 145 150 155 160

Pro Ala Ala Ala Ala Gly Ala Lys Lys Ala Lys Ser Pro Lys Lys Ala  
 165 170 175

Lys Ala Ala Lys Pro Lys Lys Ala Pro Lys Ser Pro Ala Lys Ala Lys  
 180 185 190

Ala Val Lys Pro Lys Ala Ala Lys Pro Lys Thr Ala Lys Pro Lys Ala  
 195 200 205

Ala Lys Pro Lys Lys Ala Ala Ala Lys Lys Lys  
 210 215

<210> 12  
 <211> 681  
 5 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 <400> 12

atgtcggaaa ccgctcctgc cgagacagcc accccagcgc cggaggagaa atccccggct 60  
 aagaagaagg caactaagaa ggctgccggc gccggcgtg ctaagcгаа agcgacgggg 120  
 cccccagtct cagagctgat caccaaggct gtggctgctt ctaaggagcg caatggcctt 180  
 tctttggcag cccttaagaa ggccttagcg gccggaggct acgacgtgga gaagaataac 240  
 agccgcatta agctgggctt caagagcttg gtgagcaagg gcaccctggt gcagaccaag 300  
 ggcaactggtg ctcttggtc cttaaactc aacaagaagg cggcctccgg ggaagccaag 360  
 cccaaagcca agaaggcagg cgccgctaaa gctaagaagc ccgagggggc cagcctaag 420  
 aaggccaaga aggctgcagg ggcgaaaaag gcagtgaaga agactccгаа gaaggcгаа 480  
 aagccccgcg cggctggcgt caaaaagggtg gcgaagagcc ctaagaaggc caaggccgct 540  
 gccaaaccga aaaaggcaac caagagtcct gccaaagcca aggcagtaa gccgaaggcg 600  
 gcaaagcca aagccgctaa gcccaaagca gcaaaccta aagctgcaaa ggccaagaag 660  
 10 gcggctgcca aaaagaagta g 681

<210> 13  
 <211> 226  
 <212> PRT  
 15 <213> homo sapiens  
 <400> 13

Met Ser Glu Thr Ala Pro Ala Glu Thr Ala Thr Pro Ala Pro Val Glu  
 1 5 10 15

Lys Ser Pro Ala Lys Lys Lys Ala Thr Lys Lys Ala Ala Gly Ala Gly  
 20 25 30

Ala Ala Lys Arg Lys Ala Thr Gly Pro Pro Val Ser Glu Leu Ile Thr

ES 2 372 998 T3

	35		40		45														
Lys	Ala	Val	Ala	Ala	Ser	Lys	Glu	Arg	Asn	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Ala				
	50					55					60								
Leu	Lys	Lys	Ala	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Tyr	Asp	Val	Glu	Lys	Asn	Asn				
	65				70					75					80				
Ser	Arg	Ile	Lys	Leu	Gly	Leu	Lys	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Gly	Thr	Leu				
				85					90					95					
Val	Gln	Thr	Lys	Gly	Thr	Gly	Ala	Ser	Gly	Ser	Phe	Lys	Leu	Asn	Lys				
			100					105					110						
Lys	Ala	Ala	Ser	Gly	Glu	Ala	Lys	Pro	Lys	Ala	Lys	Lys	Ala	Gly	Ala				
		115					120					125							
Ala	Lys	Ala	Lys	Lys	Pro	Ala	Gly	Ala	Thr	Pro	Lys	Lys	Ala	Lys	Lys				
	130					135					140								
Ala	Ala	Gly	Ala	Lys	Lys	Ala	Val	Lys	Lys	Thr	Pro	Lys	Lys	Ala	Lys				
	145				150					155					160				
Lys	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Lys	Lys	Val	Ala	Lys	Ser	Pro	Lys	Lys				
				165					170					175					
Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Lys	Ser	Pro	Ala	Lys				
			180					185					190						
Pro	Lys	Ala	Val	Lys	Pro	Lys	Ala	Ala	Lys	Pro	Lys	Ala	Ala	Lys	Pro				
		195					200					205							
Lys	Ala	Ala	Lys	Pro	Lys	Ala	Ala	Lys	Ala	Lys	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys				
	210					215					220								
Lys	Lys																		
	225																		

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de ácido nucleico que
  - 5 a) codifica un polipéptido que consiste en
    - (aa) dos residuos de metionina como el primero y el segundo residuos de aminoácidos en el extremo N unidos mediante un enlace peptídico a
    - 10 (ab) una histona eucariota madura;
  - b) codifica un polipéptido que consiste en
    - 15 (ba) dos residuos de metionina como el primero y el segundo residuos de aminoácidos en el extremo N unidos mediante un enlace peptídico a
    - (bb) un polipéptido eucariota maduro que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la histona eucariota madura de (a) y que esencialmente conserva su actividad biológica; o
  - 20 c) hibrida en condiciones rigurosas con la hebra complementaria de una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de (a) o (b), en el que la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene al menos dos residuos de metionina en el extremo N y conserva esencialmente la actividad biológica del polipéptido de (a) o (b).
- 25 2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la histona se selecciona del grupo que consiste en las histonas H1.0, H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5 y H1t.
3. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2.
- 30 4. Un oligonucleótido o polinucleótido antisentido de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el oligonucleótido o polinucleótido comprende los nucleótidos complementarios con los tripletes de nucleótidos que codifican los dos residuos de metionina en el extremo N de (aa), (ba) o (c) y tiene una longitud mínima de 10 nucleótidos.
- 35 5. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2.
6. Un huésped transformado con el vector de la reivindicación 5, en el que el huésped no es un ser humano y no es un embrión humano.
- 40 7. El huésped de la reivindicación 6, que es una bacteria, una célula de levadura, una célula de insecto, una célula fúngica, una célula de mamífero o una célula vegetal.
8. Un procedimiento de producir un polipéptido que comprende cultivar el huésped de la reivindicación 6 o 7 en condiciones adecuadas y aislar el polipéptido producido.
- 45 9. Un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o producido por el procedimiento de la reivindicación 8.
- 50 10. Una composición que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2 o el vector de la reivindicación 5 o el huésped de la reivindicación 6 o 7 o el polipéptido de la reivindicación 9.
11. La composición de la reivindicación 10, que además comprende la histona eucariota madura.
- 55 12. La composición de la reivindicación 10 u 11, que es una composición farmacéutica que opcionalmente comprende además un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
13. La composición de la reivindicación 10 u 11, que es una composición diagnóstica.
- 60 14. El uso de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o el vector de la reivindicación 5 o el huésped de la reivindicación 6 o 7 o el polipéptido de la reivindicación 9, para la preparación de una composición con fines terapéuticos y/o diagnósticos.
- 65 15. El uso de la reivindicación 14, en el que la finalidad terapéutica es el tratamiento de cáncer, trombocitopenia, infecciones, tales como infecciones bacterianas, víricas o fúngicas, enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus eritematoso sistémico (LES) o artritis reumatoide, colitis ulcerosa o enfermedades con fibrillas de tipo amiloide,

tales como enfermedad de Alzheimer (EA) y enfermedad de Parkinson (EP), leishmaniasis, miopatía o trastornos cardiovasculares relacionados con eventos trombóticos.

- 5 16. Un anticuerpo o aptámero o fago que reconoce de forma específica la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2 o el polipéptido de la reivindicación 9, pero no se une a la correspondiente histona eucariota madura o al correspondiente polipéptido eucariota que no tiene dos residuos de metionina en el extremo N.
17. Una composición diagnóstica que comprende el anticuerpo, aptámero y/o fago de la reivindicación 16.
- 10 18. Un procedimiento para analizar la presencia de la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2 o el polipéptido de la reivindicación 9, que comprende someter a ensayo una muestra obtenida de un sujeto para detectar la presencia de dicha molécula de ácido nucleico o polipéptido.
- 15 19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicha muestra es sangre, suero, plasma, saliva, orina, tejido mucoso, mucus.
- 20 20. Kit que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el oligonucleótido antisentido de la reivindicación 4 o el vector de la reivindicación 5 o el huésped de la reivindicación 6 o 7 o el polipéptido de la reivindicación 9 o el anticuerpo, aptámero y/o fago de la reivindicación 16 en uno o más contenedores.

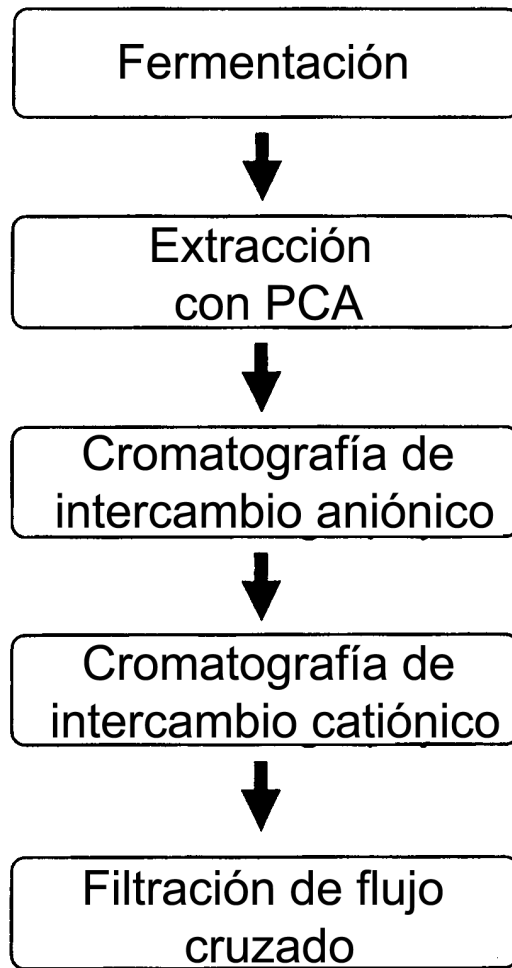


Figura 1





Figura 2

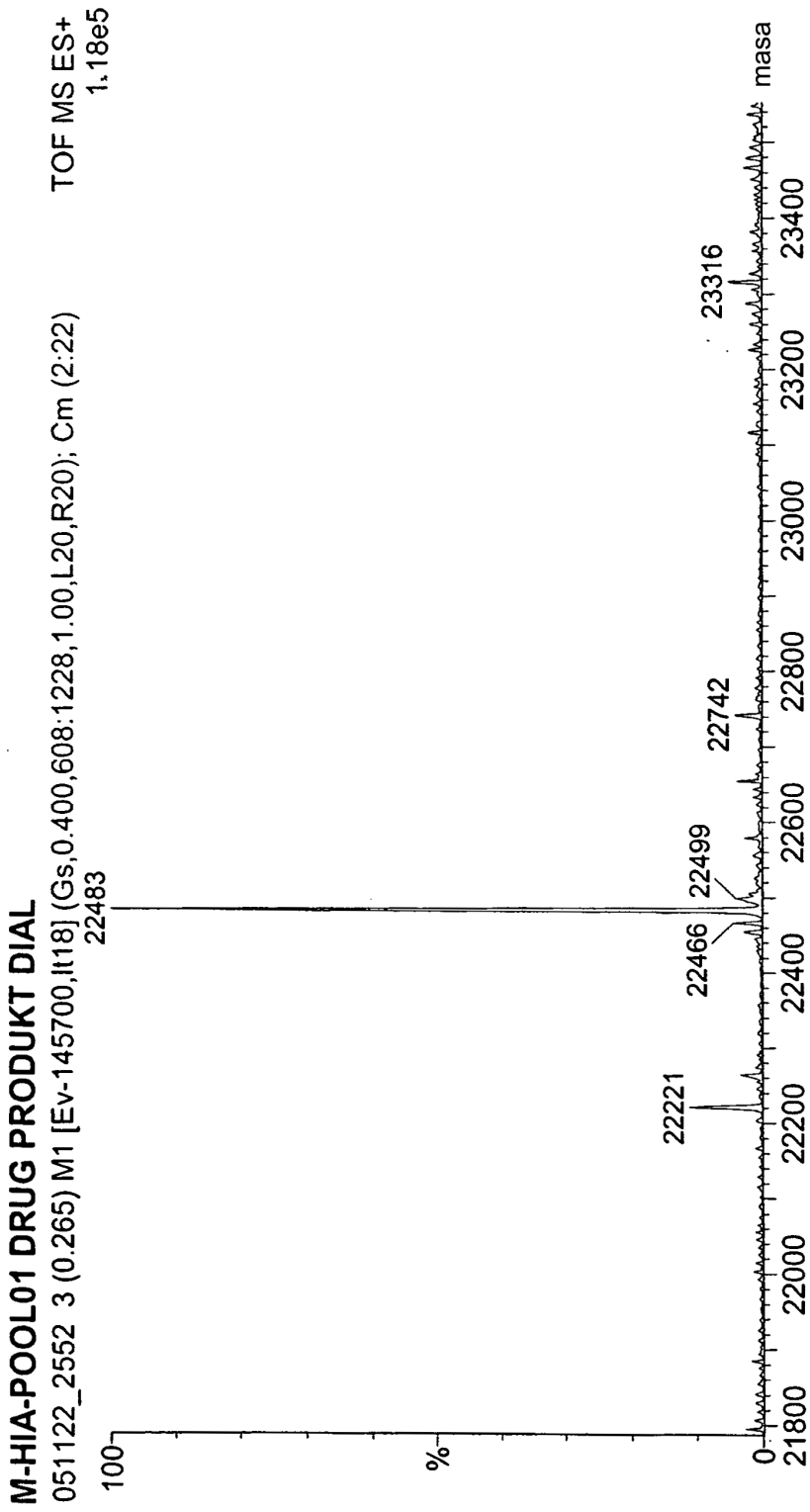


Figura 3