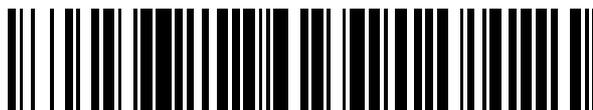


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 511**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03796403 .8**

96 Fecha de presentación: **13.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1569685**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.09.2005**

54 Título: **Moduladores de complemento dianas sobre el receptor 2 de complemento**

30 Prioridad:

15.11.2002 US 426676 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

11.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

11.12.2012

73 Titular/es:

**MUSC FOUNDATION FOR RESEARCH
DEVELOPMENT (50.0%)**

19 Hagood Avenue, Suite 909

Charleston, SC 29403, US y

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF

COLORADO, A BODY CORPORATE (50.0%)

72 Inventor/es:

TOMLINSON, STEPHEN y

HOLERS, MICHAEL V.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 392 511 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

Moduladores de complemento dianas sobre el receptor 2 de complemento

I. Antecedentes de la invención

5 El complemento es un término colectivo para una serie de proteínas sanguíneas, y es un mecanismo efector principal del sistema inmunitario. La activación del complemento y su deposición sobre estructuras diana puede conducir a la lisis celular mediada por el complemento, o puede conducir indirectamente a la destrucción celular o tisular debido a la generación de moduladores poderosos de inflamación y el reclutamiento y activación de células efectoras inmunitarias. Los productos de la activación del complemento que median la lesión tisular se generan en diversos puntos en la ruta del complemento. La activación inapropiada del complemento en tejido hospedante desempeña un papel importante en la patología de muchas enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, y es también responsable de muchos estados mórbidos asociados con bioincompatibilidad, por ejemplo inflamación post-cardiopulmonar y rechazo de trasplantes. La inhibición del complemento representa una modalidad terapéutica potencial para el tratamiento de tales enfermedades y estados mórbidos mediados inmunitariamente. Se ha demostrado que las proteínas inhibitoras del complemento, que inhiben sistémicamente el complemento, son eficaces en diversos modelos animales de enfermedad (y en unos pocos ensayos clínicos), pero los inhibidores del complemento que seleccionan como diana un sitio de enfermedad y la activación del complemento ofrecen ventajas potenciales significativas con respecto a la seguridad y eficacia.

20 En individuos sanos, la deposición del complemento en membranas celulares hospedantes es prevenida por proteínas inhibitoras del complemento expresadas en la superficie celular. Estas proteínas inhibitoras del complemento también son expresadas en la superficie de células tumorales, a menudo en niveles elevados, y se considera que son un factor contribuyente importante a la resistencia de las células tumorales a inmunoterapia mediada por anticuerpos monoclonales (anticuerpos monoclonales que seleccionan como dianas a células tumorales y activan el complemento).

25 El sistema del complemento comprende una colección de alrededor de 30 proteínas, y es uno de los mecanismos efectores principales del sistema inmunitario. La cascada del complemento es activada principalmente vía las rutas clásica (habitualmente dependiente de anticuerpos) o alternativa (habitualmente independiente de anticuerpos). La activación vía cualquier ruta conduce a la generación de C3 convertasa, que es el complejo enzimático central de la cascada. C3 convertasa escinde el C3 del suero en C3a y C3b, uniéndose este último covalentemente al sitio de activación y conduciendo a la generación posterior de C3 convertasa (bucle de amplificación). El producto de activación C3b (y también C4b generado sólo vía la ruta clásica) y sus productos de ruptura son opsoninas importantes, y están implicadas en promover la lisis de células diana mediada por células (mediante fagocitos y células NK) así como el transporte y solubilización del complejo inmunitario. Los productos de activación C3/C4 y sus receptores sobre diversas células del sistema inmunitario son también importantes a la hora de modular la respuesta inmunitaria celular. Las C3 convertasas participan en la formación de C5 convertasa, un complejo que escinde C5 para producir C5a y C5b. C5a tiene propiedades proinflamatorias y quimiotácticas poderosas, y puede reclutar y activar células efectoras inmunitarias. La formación de C5b inicia la ruta del complemento terminal, dando como resultado el ensamblaje secuencial de proteínas del complemento C6, C7, C8 y (C9)_n para formar el complejo de ataque a la membrana (MAC o C5b-9). La formación de MAC en una membrana celular diana puede dar como resultado la lisis celular directa, pero también puede provocar la activación celular y la expresión/liberación de diversos moduladores inflamatorios.

45 Hay dos clases amplias de inhibidores del complemento de la membrana; inhibidores de la ruta de activación del complemento (inhiben la formación de C3 convertasa), e inhibidores de la ruta del complemento terminal (inhiben la formación de MAC). Los inhibidores membránicos de la activación del complemento incluyen el receptor 1 del complemento (CR1), el factor acelerador del decaimiento (DAF) y la proteína cofactor de membrana (MCP). Todos ellos tienen una estructura proteica que consiste en números variables de unidades que se repiten y alrededor de 60-70 aminoácidos denominadas repeticiones de consenso cortas (SCR) que son una característica común de las proteínas de unión a C3/C4. Se han identificado los homólogos de roedores de los inhibidores de la activación del complemento humanos. La proteína de roedor Crry es un inhibidor ampliamente distribuido de la activación del complemento que funciona de forma similar tanto a DAF como MCP. Los roedores también expresan DAF y MCP, aunque parece que Crry es funcionalmente el regulador más importante de la activación del complemento en roedores. Aunque no hay homólogo de Crry encontrado en humanos, el estudio de Crry y su uso en modelos animales es clínicamente relevante.

55 El control en la ruta del complemento terminal y la formación de MAC en membranas celulares hospedantes se produce principalmente a través de la actividad de CD59, una glucoproteína de 20 kD ampliamente distribuida unida a las membranas plasmáticas mediante un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI). CD59 se une a C8 y a C9 en el ensamblaje de MAC, y evita la inserción membránica.

Actualmente están bajo investigación diversos tipos de proteínas inhibitoras del complemento para la terapia de enfermedad inflamatoria y estados mórbidos asociados con bioincompatibilidad. Dos de los inhibidores mejor caracterizados terapéuticamente del complemento humano son una forma soluble del receptor 1 de complemento

(sCR1) y un anticuerpo monoclonal anti-C5. Estas proteínas inhibitoras sistémicamente activas han demostrado eficacia en diversos modelos animales de enfermedad, y más recientemente en ensayos clínicos (1-5, 6:#1037). mAb anti-C5 inhibe la generación de C5a y el MAC, mientras que sCR1 es un inhibidor de la activación del complemento y también inhibe la generación de productos de activación de C3. También se ha demostrado que las formas solubles del factor acelerador del decaimiento humano (DAF) y la proteína cofactor de membrana (MCP), inhibidores membránicos de la activación del complemento, son protectoras en modelos animales de inflamación y bioincompatibilidad (7-11). CD59 es un inhibidor membránico del complemento que bloquea el ensamblaje del MAC, pero no afecta a la generación de opsoninas del complemento o C3a y C5a. Se han producido formas solubles de CD59, pero su baja actividad funcional in vitro, particularmente en presencia de suero, indica que sCD59 tendrá poca o ninguna eficacia terapéutica (12-15).

Es probable que el suministro de inhibidores del complemento a sitios de activación del complemento y a la enfermedad mejore su eficacia. Puesto que el complemento desempeña un papel importante en la defensa del hospedante y en el catabolismo del complejo inmunitario, los inhibidores del complemento dirigidos contra dianas también pueden reducir efectos secundarios potencialmente serios, particularmente con inhibición del complemento a largo plazo. Recientemente, se preparó una forma modificada de sCR1 decorado con sialil Lewis x (sLex), y se mostró que se une a células endoteliales que expresan selectina P y E. Se demostró que sCR1sLex es un compuesto terapéutico más potente que sCR1 en modelos de roedores de enfermedad inflamatoria (16, 17). En estudios de viabilidad in vitro, se demostró que las proteínas de fusión anticuerpo-DAF (18) y anticuerpo-CD59 (19) son más eficaces protegiendo células seleccionadas como dianas que células no seleccionadas como dianas frente al complemento. La dianización membránica no específica de inhibidores del complemento recombinantes también se ha logrado acoplado inhibidores a péptidos que se insertan en la membrana (20, 21).

Los fragmentos de activación de C3 son opsoninas del complemento abundantes encontradas en un sitio de activación del complemento, y sirven como ligandos para diversos receptores de C3. Uno de tales receptores, el receptor 2 del complemento (CR2), una proteína transmembránica, desempeña un papel importante en la inmunidad humoral por medio de su expresión predominantemente en células B maduras y células dendríticas foliculares (22, 23). CR2 es un miembro de la familia de proteínas de unión a C3, y consiste en 15-16 dominios de repeticiones de consenso cortas (SCR), unidades estructurales que son características de estas proteínas, estando el sitio de unión a C3 contenido en las dos SCRs N-terminales (24, 25). CR2 no es un inhibidor del complemento y no se une a C3b, a diferencia de los inhibidores de la activación del complemento ((DAF, MCP, CR1 y Crry). Los ligandos naturales para CR2 son iC3b, C3dg y C3d, fragmentos de ruptura de C3b unidos a células que se unen a los dos dominios de SCR N-terminales de CR2 (26, 27). La escisión de C3 da como resultado inicialmente la generación y deposición de C3b sobre la superficie celular activante. El fragmento C3b está implicado en la generación de complejos enzimáticos que amplifican la cascada del complemento. Sobre una superficie celular, C3b se convierte rápidamente en iC3b inactivo, particularmente cuando se deposita sobre una superficie hospedante que contiene reguladores de la activación del complemento (es decir, la mayoría de los tejidos hospedantes). Incluso en ausencia de reguladores del complemento unidos a membrana, se forman niveles sustanciales de iC3b. iC3b es digerido subsiguientemente hasta los fragmentos unidos a membrana C3dg y después C3d mediante proteasas séricas, pero este proceso es relativamente lento (28, 29). De este modo, los ligandos de C3 para CR2 tienen una vida relativamente larga una vez que se generan, y estarán presentes en concentraciones elevadas en sitios de activación del complemento.

La patente US 6.458.360 describe proteínas fusionadas recombinantes solubles que son estables en el sistema circulatorio de mamíferos, que comprenden un polipéptido que contiene un sitio de reconocimiento de una molécula diana, tal como un sitio del receptor del complemento, unido al extremo N-terminal de una cadena inmunoglobulínica.

II. Sumario de la invención

Según los fines de esta invención, como se realiza y describe ampliamente aquí, esta invención, en un aspecto, se refiere a moduladores de la actividad del complemento dirigidos a CR2. En particular, la invención proporciona una composición que comprende un constructo, en la que el constructo comprende:

(a) un CR2 o un fragmento del mismo, en el que el fragmento contiene al menos los dos primeros dominios de SCR N-terminales de la proteína CR2; y

(b) un modulador de la actividad del complemento, en el que el modulador de la actividad del complemento comprende un inhibidor del complemento o su fragmento, en el que dicho inhibidor del complemento se selecciona de factor acelerador del decaimiento (DAF), CD59 humana, CD59 de ratón, Crry, proteína cofactor de membrana (MCP), receptor 1 del complemento (CR1) y un anticuerpo anti-CS, en el que el fragmento del mismo comprende SCRs 1-4 de DAF, SCRs 2-4 de DAF, CD59 humana soluble sin su anclaje de glicofosfatidilinositol, CD59 de ratón soluble sin su anclaje de glicofosfatidilinositol, SCRs 1-5 de Crry, SCRs 1-4 de MCP, SCRs 1-4 de CR1, SCRs 8-11 de CR1, SCRs 15-18 de CR1 o el sitio de unión a C1q de CR1.

Las ventajas adicionales de la invención se expondrán en parte en la descripción que sigue, y en parte serán obvias a partir de la descripción, o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Las ventajas de la invención llevarán a cabo y se obtendrán por medio de los elementos y combinaciones señaladas particularmente en las

reivindicaciones anejas. Se entenderá que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son ejemplares y explicativas solamente, y no restrictivas de la invención, según se reivindica.

III. Breve descripción de los dibujos

5 Los dibujos que se acompañan, que se incorporan en esta memoria descriptiva y constituyen una parte de ella, ilustran varias realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

La Figura 1 muestra un diagrama de ejemplos de proteínas de fusión de CR2-inhibidor del complemento.

10 La Figura 2 muestra el análisis de SDS-PAGE y de transferencia Western de proteínas de fusión recombinantes purificadas e inhibidores del complemento solubles. Los geles (10% de acrilamida) se tiñeron con azul de Coomassie. Las transferencias Western se desarrollaron usando anticuerpos frente a inhibidores del complemento como el anticuerpo primario.

15 La Figura 3 muestra la unión de proteínas de fusión recombinantes a células CHO opsonizadas con C3. Las células CHO sensibilizadas a anticuerpos se incubaron en suero deficiente en C₆, se lavaron y se incubaron con inhibidor del complemento soluble (traza negra), o proteína de fusión con CR2 en el término N (traza gris claro) o el término C (traza gris oscuro) a 20 µg/ml. La unión celular de las proteínas recombinantes se detectó mediante citometría de flujo usando mAbs anti-DAF o anti-CD59. La incubación de células CHO con PBS en lugar de inhibidor del complemento dio un perfil de fluorescencia similar como sDAF y sCD59. Representativo de 3 experimentos separados.

20 La Figura 4 muestra el análisis de la interacción entre las proteínas de fusión de CR2 y C3d mediante resonancia plasmónica superficial. Las líneas sólidas indican concentraciones diferentes de proteínas de fusión de CR2. Las líneas discontinuas muestran curvas que se ajustan a un modelo de unión de Langmuir 1:1.

25 La Figura 5 muestra la lisis mediada por la inhibición del complemento mediante proteínas de fusión recombinantes sDAF y DAF. Células CHO sensibilizadas a anticuerpos (panel a) o eritrocitos de oveja (panel b) se incubaron con proteína recombinante y suero humano al 10% (células CHO) o suero humano al 0,33% (eritrocitos). Estas concentraciones dieron como resultado aproximadamente 90% de lisis de las células sin proteger. La lisis se determinó después de una incubación durante 45 min. a 37°C. La lisis de valor de referencia determinada incubando células en suero inactivado por calor fue menor que 5%, y se restó. Media +/- SD, n = 4.

30 La Figura 6 muestra la lisis mediada por la inhibición del complemento por proteínas de fusión recombinantes sCD59 y CD59. Células CHO sensibilizadas a anticuerpos (panel a) o eritrocitos de oveja (panel b) se incubaron con proteína recombinante y suero humano al 10% (células CHO) o suero humano al 0,33% (eritrocitos). Estas concentraciones dieron como resultado una lisis de aproximadamente 90% de las células sin proteger. La lisis se determinó después de una incubación durante 45 min. a 37°C. La lisis del valor de referencia, determinada incubando células en suero inactivado con calor, fue menor que 5%, y se restó. Media +/- SD, n = 4.

35 La Figura 7 muestra el efecto de proteínas de fusión recombinantes sobre la adhesión de células U937. Se sensibilizaron eritrocitos de oveja con anticuerpo IgM, y se incubaron en suero deficiente en C6. Los eritrocitos opsonizados con C3 se coincubaron con células U937 en presencia de 500 nM de proteína de fusión recombinante o PBS. Tras la incubación, el número medio de células U937 unidas por eritrocito se determinó mediante microscopía. Media +/- SD, n = 3.

40 La Figura 8 muestra la secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos predicha de CR2-DAF humana madura. Los aminoácidos subrayados representan secuencias de ligación entre CR2 y DAF.

La Figura 9 muestra la secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos predicha de CR2-CD59 humana madura. Los aminoácidos subrayados representan secuencias de ligación entre CR2 y CD59.

La Figura 10 muestra la secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos predicha de DAF-CR2 humana madura. Los aminoácidos subrayados representan las secuencias de ligación entre DAF Y CR2.

45 La Figura 11 muestra la secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos predicha de CD59-CR2 humana madura. Los aminoácidos subrayados representan las secuencias de ligación entre CD59 Y CR2.

50 La Figura 12 muestra la dianización de proteínas de fusión que contienen CR2 a células CHO revestidas con C3. El ligando de C3 se generó en células CHO incubando células en 10% de antisuero anti-CHO y 10% de suero humano sin C6 (para evitar la formación del complejo de ataque a la membrana y la lisis celular). Las células se lavaron y se incubaron con proteína de fusión (20 ug/ml, 4°C, 30 min.). La unión se detectó mediante análisis citométrico de flujo usando anticuerpos contra el inhibidor del complemento apropiado (DAF o CD59). Línea negra: control (sin proteína de fusión); gris claro: CR2 en el término C; gris oscuro: CR2 en el término N.

La Figura 13 muestra el análisis de la unión de CR2-DAF a C3dg mediante resonancia plasmónica de superficie.

La Figura 14 muestra el análisis de la unión de CR2-CD59 a C3dg mediante resonancia plasmónica de superficie.

La Figura 15 muestra el análisis de la unión de DAF-CR2 a C3dg mediante resonancia plasmónica de superficie.

La Figura 16 muestra el análisis de la unión de CD59-CR2 a C3dg mediante resonancia plasmónica de superficie.

5 La Figura 17 muestra el efecto de DAF dianizado y sin dianizar sobre la lisis de células CHO mediada por el complemento. Se sensibilizaron células CHO al complemento con antisueros anti-CHO (10% de concentración, 4°C, 30 min.) y se incubaron subsiguientemente con 10% de suero humano normal (NHS) (37°C, 60 min.) en presencia de concentraciones variables de proteínas inhibitoras del complemento. Entonces se determinó la lisis celular mediante ensayo de exclusión con azul de tripán. Experimento representativo que muestra media +/- SD (n = 3). Se llevaron a cabo tres experimentos separados usando diferentes preparaciones de proteínas de fusión.

10 La Figura 18 muestra el efecto de CD59 dianizada y no dianizada sobre la lisis de células CHO mediada por el complemento. El ensayo se llevó a cabo como se describe en la leyenda para la Figura 17. Experimento representativo que muestra media +/- SD (n = 3). Se llevaron a cabo tres experimentos separados usando diferentes preparaciones de proteínas de fusión.

15 La Figura 19 muestra el efecto de DAF dianizada y no dianizada sobre la hemólisis mediada por el complemento. Se sensibilizaron eritrocitos (E) de oveja con anticuerpo anti-E de oveja, y se incubaron subsiguientemente con una dilución 1/300 de NHS (37°C, 60 min.) en presencia de concentraciones variables de proteínas inhibitoras del complemento. La lisis celular se determinó midiendo la hemoglobina liberada (absorbancia a 412 nm). Experimento representativo que muestra media +/- SD (n = 3). Se llevaron a cabo dos experimentos separados usando diferentes preparaciones de proteínas de fusión.

20 La Figura 20 muestra el efecto de CD59 dianizada y no dianizada sobre la hemólisis mediada por el complemento. El ensayo se llevó a cabo como se describe en la leyenda para la Figura 19. Experimento representativo que muestra media +/- SD (n = 3). Se llevaron a cabo dos experimentos separados usando diferentes preparaciones de proteínas de fusión.

25 La Figura 21 muestra la secuencia nucleotídica y de aminoácidos predicha de CR2-Fc de IgG1 humana humana madura. Los aminoácidos subrayados representan secuencias de ligación entre CR2 y la región Fc. El plásmido de expresión contiene la región Fc genómica (bisagra-intrón-CH2-intrón-CH3).

La Figura 22 muestra el análisis de SDS-PAGE de la proteína de fusión CR2-Fc. CR2-Fc purificada se hizo pasar en condiciones no reductoras (línea 1) o reductoras (línea 2). El gel se tiñó mediante azul de Coomassie (para MW de marcadores en línea 3, véase la Figura 2).

30 La Figura 23 muestra la dianización de CR2-Fc a células CHO revestidas con C3. El ligando de C3 se generó como se describió (leyenda para la Figura 12). Las células se lavaron y se incubaron con CR2-Fc (20 ug/ml, 4°C, 30 min.). La unión se detectó mediante análisis citométrico de flujo usando anticuerpos frente a Fc humano conjugado a FITC. El panel superior muestra los resultados de la incubación de CR2-Fc con células CHO revestidas con C3, y el panel inferior muestra los resultados de la incubación de CR2-Fc con células CHO de control.

35 La Figura 24 muestra el sensograma de resonancia plasmónica de superficie que muestra la unión de CR2-Fc a ligando de C3d inmovilizado sobre un chip.

La Figura 25 muestra la biodistribución de ¹²⁵I-CR2-DAF y ¹²⁵I-sDAF en ratones NZB/W F1 de 34 semanas. Se inyectaron proteínas radiomarcadas en la vena de la cola, y se determinó la biodistribución del radiomarcador después de 24 h. Cada proteína se inyectó en 2 ratones.

40 La Figura 26 muestra la formación de imágenes de CR2-DAF unida a glomérulos de ratones MRL/lpr de 24 semanas. La unión glomerular de CD2-DAF (a) y sDAF (b) se analizó 24 horas después de la inyección de cada proteína en la vena de la cola. La figura muestra la tinción de inmunofluorescencia de secciones del riñón.

45 La Figura 27 muestra el constructo CD59-Crry de anticuerpo monocatenario. La figura muestra que el constructo comprende una cadena ligera variable (VL) y una cadena pesada variable (VH) de mAb K9/9. El constructo se preparó en el vector de expresión de levadura pPICZalph (Invitrogen).

La Figura 28 muestra la biodistribución de inhibidores del complemento y Ab monocatenario K9/9 en ratas. Las proteínas recombinantes yodadas se administraron 4 días después del tratamiento con PAN, y la radioactividad en los órganos se midió 48 h más tarde.

50 La Figura 29 muestra el aclaramiento de creatinina en ratas tratadas con PAN y que reciben la terapia indicada (n = 4, +/- SD).

La Figura 30 muestra la corteza renal teñida con PAS. La Figura 30A muestra el control sin PAN, la Figura 30B: tratamiento de PAN con PBS, la Figura 30C: tratamiento de PAN con Cry K9/9 dianizado, y la Figura 30D: tratamiento de PAN con sCry.

La Figura 31 muestra la actividad inhibidora del complemento en suero tras la administración de proteínas recombinantes. Medida mediante lisis de eritrocitos de oveja sensibilizados. Se muestra el porcentaje de actividad inhibidora con relación a suero procedente de ratas de control.

IV. Descripción detallada

5 La presente invención se puede entender más fácilmente mediante referencia a la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención y los Ejemplos incluidos allí, y a las Figuras y su descripción previa y siguiente.

A. Definiciones

10 Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones anejas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales excepto que el contexto indique claramente otra cosa. De este modo, por ejemplo, la referencia a “un vehículo farmacéutico” incluye mezclas de dos o más de tales vehículos, y similares.

15 Los intervalos se pueden expresar aquí como de “alrededor de” un valor particular, y/o hasta “alrededor de” otro valor particular. Cuando se expresa tal intervalo, otra realización incluye desde el un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De forma similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante uso del antecedente “alrededor de”, se entenderá que el valor particular forma otra realización. Se entenderá además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final, como independientemente del otro punto final.

En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a un número de términos que se han de definir por tener los siguientes significados:

20 “Opcional” u “opcionalmente” significa que el suceso o circunstancia descrito subsiguientemente puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho suceso o circunstancia se produce y casos en los que no.

25 “Tratamiento” o “tratar” significa administrar una composición a un sujeto con una afección, en el que la afección puede ser una enfermedad patógena, enfermedad autoinmunitaria, cáncer o afección inflamatoria. El efecto de la administración de la composición al sujeto puede tener el efecto de, pero no se limita a, reducir los síntomas de la afección, una reducción en la gravedad de la afección, o la eliminación completa de la afección.

Aquí, “inhibición” o “inhibe” significa reducir la actividad. Se entiende que la inhibición puede significar una reducción ligera en la actividad hasta la eliminación completa de toda la actividad. Un “inhibidor” puede ser cualquiera que reduzca la actividad.

30 Aquí, “activación” o “activa” significa que incrementa la actividad. Se entiende que la activación puede significar un incremento en la actividad existente, así como la inducción de nueva actividad. Un “activador” puede ser cualquiera que incremente la actividad.

B. Inhibición del complemento y constructos activantes

Se describen composiciones que comprenden un constructo, en las que el constructo comprende CR2 y un modulador de la actividad del complemento.

35 CR2 consiste en una porción extracelular que consiste en 15 ó 16 unidades que se repiten conocidas como repeticiones de consenso cortas (SCRs). Los aminoácidos 1-20 comprenden el péptido líder, los aminoácidos 23-82 comprenden SCR1, los aminoácidos 91-146 comprenden SCR2, los aminoácidos 154-210 comprenden SCR3, los aminoácidos 215-271 comprenden SCR4. El sitio activo (sitio de unión a C3dg) está situado en SCR 1-2 (las 2 primeras SCRs N-terminales). Las unidades SCR están separadas por secuencias cortas de longitud variable que sirven como espaciadores. Se entiende que se puede usar cualquier número de SCRs que contienen el sitio activo. 40 En una realización, el constructo contiene las 4 unidades SCR N-terminales. En otra realización, el constructo incluye las dos primeras SCRs N-terminales. En otra realización, el constructo incluye las tres primeras SCRs N-terminales.

45 Se entiende que existe variación de especie y de cepa para los péptidos, polipéptidos, proteínas, fragmentos proteicos y composiciones descritos. Se describen específicamente todas las variaciones de especies y de cepas para los péptidos, polipéptidos, proteínas, fragmentos proteicos y composiciones descritos.

También se describen composiciones en las que el constructo es una proteína de fusión.

50 Aquí, una “proteína de fusión” significa dos o más componentes que comprenden péptidos, polipéptidos o proteínas operablemente enlazados. CR2 se puede enlazar a inhibidores o activadores del complemento mediante cualquier secuencia de ligación de aminoácidos. Los ejemplos de ligadores son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de ligadores pueden incluir, pero sin limitarse a, (Gly₄Ser)₃ (G4S), (Gly₃Ser)₄ (G3S), SerGly₄, y SerGly₄SerGly₄. Las secuencias de ligación también pueden consistir en secuencias de ligación “naturales” encontradas entre las

unidades SCR con proteínas humanas (o de ratón), por ejemplo VSVFPLE, la secuencia de ligación entre SCR 2 y 3 de CR2 humano. Las proteínas de fusión también se pueden construir sin secuencias de ligación.

También se describen composiciones de la invención, en las que la proteína de fusión inhibe el complemento.

5 También se describen composiciones de la invención, en las que el modulador de la actividad del complemento comprende un inhibidor del complemento.

10 También se describen composiciones de la invención, por ejemplo, en las que el inhibidor del complemento es el factor acelerador del decaimiento (DAF) SEC ID NO: 1 (nucleótido) y SEC ID NO: 2 (aminoácido). Por ejemplo, el DAF puede ser DAF humano soluble que comprende los cuatro dominios de SCR sin anclaje glicofosfatidílico y región rica en serina-treonina. El DAF también puede ser DAF humano soluble que comprende los cuatro dominios de SCR y la región rica en serina-treonina pero sin el anclaje de glicofosfatidilo.

15 La región extracelular de DAF consiste en 4 unidades SCR en el término N seguido de una región rica en serina/treonina. Los aminoácidos 1-34 comprenden el péptido líder, los aminoácidos 35-95 comprenden SCR1, los aminoácidos 97-159 comprenden SCR2, los aminoácidos 162-221 comprenden SCR3, los aminoácidos 224-284 comprenden SCR4, y los aminoácidos 287-356 comprenden la región S/T. En una realización de la invención, la composición de la invención comprende todas las 4 unidades SCR. En otra realización de la invención, la composición comprende SCR2-4 de DAF.

20 Se describen composiciones de la invención, en las que el inhibidor del complemento comprende una proteína de fusión entre CD59 y otro inhibidor del complemento seleccionado del grupo que consiste en DAF, MCP, Crry y CR1. También se describen composiciones de la invención, en las que el inhibidor del complemento es una proteína de fusión de dos o más inhibidores del complemento.

También se describen composiciones de la invención, en las que la proteína de fusión comprende CR2-DAF (SEC ID NO: 6). También se describen composiciones de la invención en las que la proteína de fusión está codificada por un nucleótido que comprende SEC ID NO: 5.

25 También se describen composiciones de la invención, en las que la proteína de fusión comprende DAF-CR2 (SEC ID NO: 10). También se describen composiciones de la invención en las que la proteína de fusión está codificada por un nucleótido que comprende SEC ID NO: 9.

También se describen composiciones de la invención, en las que el inhibidor del complemento es CD59 humana (SEC ID NO: 3 (nucleótido) y SEC ID NO: 4 (aminoácido)). La CD59 humana puede ser CD59 humana soluble que comprende la proteína madura sin anclaje glicofosfatidílico.

30 También se describen composiciones de la invención, en las que la proteína de fusión comprende CR2-CD59 humana (SEC ID NO: 8). También se describen composiciones de la invención en las que la proteína de fusión está codificada por un nucleótido que comprende SEC ID NO: 7.

35 También se describen composiciones de la invención, en las que la proteína de fusión comprende CD59 humana-CR2 (SEC ID NO: 12). También se describen composiciones de la invención en las que la proteína de fusión está codificada por un nucleótido que comprende SEC ID NO: 10.

40 También se describen composiciones de la invención, en las que el inhibidor del complemento es CR1 (SEC ID NO: 13 (nucleótido) y SEC ID NO: 14 (aminoácido)). La región extracelular de CR1 puede comprender 30 unidades SCR. Es una realización de la invención que la composición pueda comprender toda la región extracelular de CR1. En otra realización de la invención, la composición comprende [el] un sitio activo de CR1. Los sitios activos de CR1 son los aminoácidos 1-46 que comprenden el péptido líder, los aminoácidos 47-300 que comprenden SCR-4 (sitio de unión a C4b, menor afinidad por C3b), los aminoácidos 497-750 que comprenden SCR8-11 (sitio de unión a C3b, menor afinidad por C4b), los aminoácidos 947-1200 que comprenden SCR15-18 (sitio de unión a C3b, menor afinidad por C4b), y los aminoácidos 1400-1851 que comprenden el sitio de unión a C1q. En una realización adicional de la invención, la composición de la invención puede comprender [una] cualquiera combinación o todos los sitios activos de CR1.

45 También se describen composiciones de la invención, en las que el inhibidor del complemento comprende los sitios activos de CR1, y en las que [el] un sitio activo comprende además un péptido líder que comprende los aminoácidos 6-46, los aminoácidos 47-300 que comprenden SCR-4 (sitio de unión a C4b, menor afinidad por C3b), los aminoácidos 497-750 que comprenden SCR8-11 (sitio de unión a C3b, menor afinidad por C4b), los aminoácidos 947-1200 que comprenden SCR15-18 (sitio de unión a C3b, menor afinidad por C4b), y los aminoácidos 1400-1851 que comprenden el sitio de unión a C1q. En una realización adicional de la invención, la composición de la invención puede comprender cualquier [una] combinación o todos los sitios activos de CR1.

55 También se describen composiciones de la invención, en las que el inhibidor del complemento es MCP (SEC ID NO: 15 (nucleótido) y SEC ID NO: 16 (aminoácido)). La región extracelular consiste en 4 unidades SCR seguidas de la región ser/thr. Los aminoácidos 1-34 comprenden el péptido líder, los aminoácidos 35-95 comprenden SCR1, los

aminoácidos 96-158 comprenden SCR2, los aminoácidos 159-224 comprenden SCR3, los aminoácidos 225-285 comprenden SCR4, y los aminoácidos 286-314 comprenden la región S/T.

También se describen composiciones de la invención, en las que el inhibidor del complemento es Crry (SEC ID NO: 17). Crry puede ser Crry de ratón soluble que comprende los 5 dominios SCR N-terminales sin la región transmembránica.

También se describen composiciones de la invención, en las que el inhibidor del complemento es CD59 murino. El CD59 murino puede ser CD59 murino soluble que comprende la proteína madura sin anclaje glicofosfatídico.

Se describen composiciones de la invención, en las que la proteína de fusión activa el complemento.

Se describen composiciones de la invención, en las que el constructo está en un vector.

Se describen células que comprenden el vector de la invención.

Los grupos reactivos que se pueden dianizar usando un agente de reticulación incluyen aminas primarias, sulfhidrilos, carbonilos, hidratos de carbono y ácidos carboxílicos, o se pueden añadir a las proteínas grupos activos. Los ejemplos de ligadores químicos son bien conocidos en la técnica, y pueden incluir, pero no se limitan a, bismaleimidoetano, éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida, agentes de reticulación de ésteres de NHS-maleimida tales como MBS, Sulfo-MBS, SMPB, Sulfo-SMPB, GMBS, Sulfo-GMBS, EMCS, Sulfo-EMCS; agentes de reticulación de imidoésteres tales como DMA, DMP, DMS, DTBP; EDC [hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida], [2-(4-hidroxifenil)etil]-4-*N*-maleimidometil-ciclohexano-1-carboxamida, DTME: ditiobismaleimidoetano, DMA (adipimidato de dimetil-2 HCl), DMP (pimelimidato de dimetil-2 HCl), DMS (suberimidato de dimetil-2 HCl), DTBP (3,3'-ditiobispropionimidato de dimetil-2 HCl), MBS, (éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida), Sulfo-MBS (éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida), Sulfo-SMPB (4-*p*-maleimidofenil]butirato de sulfosuccinimidilo), GMBS (éster de *N*[-maleimidobutiriloxi]succinimida), EMCS (éster de *N*[-maleimidocaproiloxi]succinimida), y Sulfo-EMCS (éster de *N*[-maleimidocaproiloxi]sulfosuccinimida).

C. Métodos para usar las composiciones

Actualmente están bajo investigación diversos tipos de proteínas inhibidoras del complemento para terapia de enfermedad inflamatoria y estados mórbidos asociados con bioincompatibilidad. Dos de los inhibidores mejor caracterizados terapéuticamente del complemento humano son una forma soluble del receptor 1 del complemento (sCR1) y un anticuerpo monoclonal anti-C5. Estas proteínas inhibidoras sistémicamente activas han mostrado eficacia en diversos modelos animales de enfermedad, y más recientemente en ensayos clínicos (1-5, 6:#1037 que incluye enseñanzas sobre la eficacia *in vivo* y resultados clínicos).

La composición de la invención se puede usar en métodos para tratar una afección afectada por el complemento en un sujeto. Se entiende que la administración de la composición del sujeto puede tener el efecto de, pero no se limita a, reducir los síntomas de la afección, una reducción en la gravedad de la afección, o la eliminación completa de la afección.

1. Métodos para usar las composiciones para inhibir el complemento

Se describe la composición de la invención para uso en métodos para tratar una afección afectada por el complemento en un sujeto, en la que la composición mostrará actividad del complemento. Se entiende que el efecto de la administración de la composición al sujeto puede tener el efecto de, pero no se limita a, reducir los síntomas de la afección, una reducción en la gravedad de la afección, o la eliminación completa de la afección.

Se describe la composición de la invención para uso en métodos para reducir daño mediado por el complemento, composición la cual inhibe el complemento.

La afección tratada puede ser una afección inflamatoria. La afección inflamatoria se puede seleccionar del grupo que consiste en asma, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis reactiva, espondilartritis, vasculitis sistémica, diabetes mellitus dependiente de insulina, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica experimental, síndrome de Sjögren, enfermedad de hospedante frente a injerto, enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lesión por reperusión isquémica, infarto de miocardio, enfermedad de Alzheimer, rechazo de trasplantes (alógeno y xenogénico); trauma térmico; cualquier inflamación inducida por complejo inmunitario, glomerulonefritis, miastenia grave, lupus cerebral, síndrome de Guillain-Barre, vasculitis, esclerosis sistémica, anafilaxis, reacciones al catéter, ateroma, infertilidad, tiroiditis, ARDS, síndrome de post-bypass, hemodiálisis, reumatoide juvenil, síndrome de Behcet, anemia hemolítica, pénfigo, penfigoide ampolloso, apoplejía, aterosclerosis, y esclerodermia.

La afección puede ser una infección vírica. La infección vírica se puede seleccionar de la lista de virus que consiste en virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus sincitial respiratorio, virus del Dengue, virus de fiebre amarilla, virus del Ébola, virus de Marburg, virus de la fiebre de Lassa, virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalitis

japonesa, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la fiebre del Valle de Murray, virus del Nilo occidental, virus de la fiebre del Valle del Rift, rotavirus A, rotavirus B, rotavirus C, virus de Sindbis, Hantavirus.

5 La afección puede ser una respuesta inflamatoria a un vector vírico. El vector vírico se puede seleccionar de la lista de virus que consiste en adenovirus, virus de la vacuna, virus adenoasociado, virus Ankara de la vacuna modificado, y citomegalovirus. Se entiende que se pueden usar otros vectores víricos para el suministro de la vacuna. Se describen específicamente todos y cada uno de los vectores víricos conocidos en la técnica.

10 Se entiende en la técnica que Candida expresa una proteína semejante a CR3 que tiene propiedades de unión similares como CR2. La proteína semejante a CR3 parece que está implicada en la patogénesis. Por lo tanto, una realización de la invención es el tratamiento de un sujeto con una infección fúngica, en el que el tratamiento bloquea la función de "CR3" fúngica así como inhibe el complemento, que comprende administrar a un sujeto la composición de la invención.

Se describen usos de la invención, en los que el inhibidor del complemento pueden potenciar el resultado de la terapia a base de apoptosis (por ejemplo, terapia génica con adenovirus que expresa el ligando Fas).

15 La apoptosis que se produce durante el desarrollo normal no es inflamatoria, y está implicada en la inducción de tolerancia inmunológica. Aunque la muerte celular apoptótica puede ser inflamatoria dependiendo de cómo se active y en qué tipos celulares (por ejemplo, agentes terapéuticos que ligan Fas son capaces de inducir inflamación), la muerte celular necrótica da como resultado una respuesta inflamatoria sostenida y poderosa mediada por contenidos celulares liberados y por citocinas proinflamatorias liberadas por fagocitos estimulados. Las células apoptóticas y las vesículas normalmente son aclaradas por fagocitos, evitando así las consecuencias proinflamatorias de la lisis celular. En este contexto, se ha demostrado que las células apoptóticas y los cuerpos apoptóticos fijan directamente el complemento, y que el complemento puede sostener una respuesta antiinflamatoria debido a la opsonización y fagocitosis potenciada de las células apoptóticas.

25 La inflamación está implicada en el reclutamiento no específico de células inmunitarias que puede influir en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. La modulación de la activación del complemento durante la terapia tumoral a base de apoptosis para inhibir la captación fagocítica de células/cuerpos apoptóticos potencia la respuesta inmunitaria inflamatoria/innata en el entorno del tumor. Además, las células apoptóticas pueden ser una fuente de autoantígenos inmunógenos y cuerpos apoptóticos sin aclarar que da como resultado la autoinmunización. Además de crear un entorno inmunoestimulante mejorado, la modulación del complemento en un sitio en el que se ha inducido a las células tumorales a sufrir apoptosis aumenta o dispara adicionalmente la inmunidad específica frente a un tumor al cual el hospedante es normalmente tolerante.

30 Las composiciones descritas de la invención pueden actuar como antagonistas de CR2 y CR3. La actividad del complemento se puede inhibir vía la inhibición de CR2, que comprende administrar la composición de la invención a un sujeto. La actividad del complemento se puede inhibir vía la inhibición de CR3, que comprende administrar la composición de la invención a un sujeto. Puesto que un antagonista de CR2 puede modular la respuesta inmunitaria, un antagonista de CR3 puede tener un segundo mecanismo antiinflamatorio de acción puesto que CR3 es integrina que se une a ICAM1 endotelial. ICAM1 es expresado en sitios de inflamación, y está implicado en adhesión leucocitaria y diapedesis. Además, la expresión de ICAM1 está aumentada por productos de activación del complemento.

3. Métodos para usar las composiciones como herramientas de investigación

40 Las composiciones descritas se pueden usar en una variedad de formas como herramientas de investigación. Por ejemplo, las composiciones descritas se pueden usar para estudiar inhibidores de la activación del complemento.

45 Las composiciones descritas se pueden usar como herramientas de diagnóstico relacionadas con enfermedades asociadas con la activación del complemento, tales como cáncer, infecciones víricas, infecciones bacterianas, infecciones parasitarias, e infecciones fúngicas. Las proteínas de fusión con CR2 seleccionarán como diana un sitio de activación del complemento, y una proteína de fusión con CR2 marcada puede diagnosticar afecciones asociadas con la activación del complemento. Por ejemplo, un anticuerpo reactivo al tumor activaría el complemento sobre células tumorales, que entonces podrían seleccionar como diana a CR2. La CR2-Fc marcada podría amplificar entonces la señal tras la dianización del anticuerpo.

D. Composiciones

50 Se describen componentes a usar para preparar las composiciones descritas, así como las propias composiciones a usar en los métodos descritos aquí. Estos y otros materiales se describen aquí, y se entiende que cuando se describen composiciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales, que aunque puede que no se haga explícitamente referencia específica a cada una de las diversas combinaciones y permutaciones individuales y colectivas de estos compuestos, cada uno se contempla y se describe específicamente aquí. Por ejemplo, si se describe una CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, particular, y/o se describe y se discute una combinación específica de los mismos, y/o se discute un número de modificaciones que se pueden hacer a un número de moléculas que incluyen CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, y/o sus combinaciones, se contempla

específicamente que todas y cada una de las combinaciones y permutaciones de CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, o su combinación, y las modificaciones que son posibles, excepto que se indique específicamente lo contrario. De este modo, si se describe una clase de moléculas A, B y C, así como una clase de moléculas D, E y F, y se describe un ejemplo de una molécula de combinación A-D, entonces incluso si cada uno no está citado individualmente, cada uno está contemplado individual y colectivamente considerándose descritas las combinaciones A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E, y C-F. Igualmente, también se describe cualquier subconjunto o combinación. De este modo, por ejemplo, el subgrupo de A-E, B-F y C-E se consideraría descrito. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta solicitud, incluyendo, pero sin limitarse a, etapas en los métodos para obtener y usar las composiciones descritas. De este modo, si hay una variedad de etapas adicionales que se pueden llevar a cabo, se entiende que cada una de estas etapas adicionales se puede llevar a cabo con cualquier realización específica o combinación de realizaciones de los métodos descritos.

1. Similitudes de secuencias

Se entiende que, como se explica aquí, el uso de los términos homología e identidad significa lo mismo que similitud. De este modo, por ejemplo, si se usa el uso de la palabra homología entre dos secuencias no naturales, se entiende que no está indicando necesariamente una relación evolutiva entre estas dos secuencias, sino más bien está mirando las similitudes o relaciones entre sus secuencias de ácidos nucleicos. Muchos de los métodos para determinar la homología entre dos moléculas evolutivamente relacionadas se aplican de forma habitual a cualquiera de dos o más ácidos nucleicos o proteínas con el fin de medir la similitud de secuencias independientemente de si están evolutivamente relacionadas o no.

En general, se entiende que una manera para definir cualesquiera variantes y derivados conocidos, o aquellos que puedan surgir, de los genes y proteínas descritos aquí, es definiendo las variantes y derivados en términos de homología con secuencias conocidas específicas. Esta identidad de secuencias particulares descritas aquí también se explica en cualquier otra parte aquí. Por ejemplo, SEC ID NO: 25 expone una secuencia particular de una CR2, y SEC ID NO: 26 expone una secuencia particular de la proteína codificada por SEC ID NO: 25, una proteína CR2. Se describen específicamente variantes de estos y de otros genes y proteínas descritos aquí que tienen al menos una homología del 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento con la secuencia señalada. Los expertos en la técnica entenderán fácilmente cómo determinar la homología de dos proteínas o ácidos nucleicos, tales como genes. Por ejemplo, la homología se puede calcular después de alinear las dos secuencias de manera que la homología esté en su nivel más elevado.

Otra manera de calcular la homología se puede llevar a cabo mediante algoritmos publicados. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede llevar a cabo mediante algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante la búsqueda de similitud mediante el método de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Los mismos tipos de homología se pueden obtener para ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante los algoritmos descritos en Zuker, *M. Science* 244:48-52, 1989, Jaeger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7706-7710, 1989, Jaeger et al. *Methods Enzymol.* 183:281-306, 1989 para al menos material relacionado con alineamiento de ácidos nucleicos. Se entiende que se puede usar típicamente cualquiera de los métodos, y que en ciertos casos los resultados de estos métodos pueden diferir, pero el experto entiende que, si se encuentra identidad con al menos uno de estos métodos, se podría afirmar que las secuencias tienen la identidad señalada, y se describirían aquí.

Por ejemplo, como se usa aquí, una secuencia citada por tener un porcentaje de homología particular con otra secuencia se refiere a secuencias que tienen la homología citada según se calcula mediante uno cualquiera o más de los métodos de cálculo descritos anteriormente. Por ejemplo, una primera secuencia tiene 80 por ciento de homología, como se define aquí, con una segunda secuencia si la primera secuencia se calcula que tiene 80 por ciento de homología con la segunda secuencia usando el método de cálculo de Zuker, incluso si la primera secuencia no tiene 80 por ciento de homología con la segunda secuencia según se calcula mediante cualquiera de los otros métodos de cálculo. Como otro ejemplo, una primera secuencia tiene 80 por ciento de homología, como se define aquí, con una segunda secuencia si se calcula que la primera secuencia tiene un 80 por ciento de homología con la segunda secuencia usando tanto el método de cálculo de Zuker como el método de cálculo de Pearson y Lipman, incluso si la primera secuencia no tiene 80 por ciento de homología con la segunda secuencia según se calcula mediante el método de cálculo de Smith y Waterman, el método de cálculo de Needleman y Wunsch, el método de cálculo de Jaeger, o cualquiera de los otros métodos de cálculo. Según todavía otro ejemplo, una primera secuencia tiene 80 por ciento de homología, como se define aquí, con una segunda secuencia si se calcula que la primera secuencia tiene 80 por ciento de homología con la segunda secuencia usando cada uno de los métodos de cálculo (aunque, en la práctica, los diferentes métodos de cálculo darán a menudo como resultados porcentajes de homología calculados diferentes).

2. Ácidos nucleicos

Hay una variedad de moléculas descritas aquí que se basan en ácidos nucleicos, incluyendo por ejemplo los ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, CR2-DAF, DAF-CR2, CR2-CD59, CD59-CR2, CR2-CR1, CR1-CR2, CR2-MCP, MCP-CR2, CR2-Crry, Crry-CR2, CR2-anti-C5, así como diversos ácidos nucleicos funcionales. Los ácidos nucleicos descritos están formados, por ejemplo, de nucleótidos, análogos nucleotídicos, o sustitutos nucleotídicos. Se explican aquí ejemplos no limitantes de estas y otras moléculas. Por ejemplo, se entiende que cuando un vector es expresado en una célula, el ARNm expresado estará formado típicamente por A, C, G y U. Igualmente, se entiende que, por ejemplo, si se introduce una molécula antisentido en una célula o entorno celular mediante, por ejemplo, suministro exógeno, es ventajoso que la molécula antisentido esté formada por análogos nucleotídicos que reduzcan la degradación de la molécula antisentido en el entorno celular.

a) Nucleótidos y moléculas relacionadas

Un nucleótido es una molécula que contiene un resto de base, un resto de azúcar y un resto de fosfato. Los nucleótidos se pueden enlazar juntos a través de sus restos de fosfato y sus restos de azúcar, creando un enlazamiento internucleosídico. El resto de base de un nucleótido puede ser adenin-9-ilo (A), citosin-1-ilo (C), guanin-9-ilo (G), uracil-1-ilo (U), y timidin-1-ilo (T). El resto de azúcar de un nucleótido es una ribosa o una desoxirribosa. El resto de fosfato de un nucleótido es fosfato pentavalente. Un ejemplo no limitante de nucleótido sería 3'-AMP (monofosfato de 3'-adenosina) o 5'-GMP (monofosfato de 5'-guanosa).

Un análogo nucleotídico es un nucleótido que contiene algún tipo de modificación ya sea en los restos de base, de azúcar o de fosfato. Las modificaciones al resto de base incluirían modificaciones naturales o sintéticas de A, C, G, y T/U, así como bases purínicas o pirimidínicas diferentes, tales como uracil-5-ilo (.psi.), hipoxantin-9-ilo (I), y 2-aminoadenin-9-ilo. Una base modificada incluye, pero no se limita a, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquil, 8-hidroxil y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, uracilos y citosinas 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Las modificaciones de base adicionales se pueden encontrar, por ejemplo, en la patente U.S. nº 3.687.808, Englisch et al., *Angewandte Chemie*, Edición Internacional, 1991, 30, 613, y Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B. ed., CRC Press, 1993. Ciertos análogos nucleotídicos, tales como pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. 5-metilcitosina pueden incrementar la estabilidad de la formación del dúplex. A menudo, las modificaciones de base se pueden combinar, por ejemplo, con una modificación de azúcar, tal como 2'-O-metoxietilo, para lograr propiedades únicas tales como estabilidad aumentada del dúplex. Hay numerosas patentes de los Estados Unidos, tales como 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; y 5.681.941, que detallan y describen un intervalo de modificaciones de base.

Los análogos nucleotídicos también pueden incluir modificaciones del resto de azúcar. Las modificaciones al resto de azúcar incluirían modificaciones naturales de la ribosa y desoxirribosa, así como modificaciones sintéticas. Las modificaciones de azúcar incluyen, pero no se limitan a, las siguientes modificaciones en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquil-O-alquilo, en las que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo de C₁ a C₁₀, o alqueno de C₂ a C₁₀ y alquino sustituidos o no sustituidos. Las modificaciones de azúcar en 2' también incluyen, pero no se limitan a, -O[(CH₂)_n O]_m CH₃, -O(CH₂)_n, OCH₃, -O(CH₂)_n, NH₂, -O(CH₂)_n CH₃, -O(CH₂)_n -ONH₂, y -O(CH₂)_n ON[(CH₂)_n CHO₃]₂, en los que n y m son de 1 a alrededor de 10.

Otras modificaciones en la posición 2' incluyen, pero no se limitan a: alquilo inferior de C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂ CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones en el azúcar, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los azúcares modificados también incluirían aquellos que contienen modificaciones en el oxígeno del anillo que forma un puente, tales como CH₂ y S. Los análogos de azúcar nucleotídicos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilicos en lugar del azúcar pentofuranosilo. Hay numerosas patentes de los Estados Unidos que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas, tales como 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

Los análogos nucleotídicos también se pueden modificar en el resto de fosfato. Los restos de fosfato modificados incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se pueden modificar de manera que el enlace entre dos nucleótidos contiene un fosforotioato, fosforotioato quirál, fosforoditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, metil y otros alquilfosfonatos, incluyendo 3'-alquilenfosfonato y fosfatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos, incluyendo 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres, y boranofosfatos. Se entiende que este enlace de fosfato o de fosfato modificado entre dos nucleótidos puede ser a través de un enlace 3'-5' o un enlace 2'-5', y el enlace puede contener polaridad invertida tal como 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácidos libres. Numerosas patentes de los Estados Unidos enseñan cómo obtener y usar nucleótidos que contienen fosfatos modificados, e incluyen pero no se limitan a 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

Se entenderá que los análogos nucleotídicos necesitan contener solamente una única modificación, pero también pueden contener múltiples modificaciones en uno de los restos o entre diferentes restos.

Los sustitutos nucleotídicos son moléculas que tienen propiedades funcionales similares a nucleótidos, pero que no contienen resto de fosfato, tal como un ácido nucleico peptídico (PNA). Los sustitutos nucleotídicos o moléculas que reconocerán ácidos nucleicos en una manera de Watson-Crick o Hoogsteen, pero que están enlazados juntos a través de un resto distinto del resto de fosfato. Los sustitutos nucleotídicos son capaces de conformarse en una estructura de tipo de doble hélice cuando interactúan con el ácido nucleico diana apropiado.

Los sustitutos nucleotídicos son nucleótidos o análogos nucleotídicos a los que se les ha sustituido el resto de fosfato y/o los restos de azúcar. Los sustitutos nucleotídicos no contienen un átomo de fósforo estándar. Los sustitutos para el fosfato pueden ser, por ejemplo, enlaces internucleosídicos alquílicos o cicloalquílicos de cadena corta, enlaces internucleosídicos mixtos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales siloxánicas; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metilenformacetilo y tioformacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilnimino y metilhidrazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales amídicas; y otros que tienen partes de componentes N, O, S y CH₂ mixtas. Numerosas patentes de los Estados Unidos describen cómo obtener y usar estos tipos de sustituciones de fosfato, e incluyen, pero no se limitan a, 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

También se entiende en un sustituto nucleotídico que tanto los restos de azúcar como de fosfato del nucleótido se pueden sustituir, por ejemplo, mediante un enlace de tipo amida (aminoetilglicina) (PNA). Las patentes de los Estados Unidos 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262 enseñan cómo obtener y usar moléculas de PNA. (Véase también Nielsen et al., *Science*, 1991, 254, 1497-1500).

También es posible enlazar otros tipos de moléculas (conjugados) a nucleótidos o análogos nucleotídicos para mejorar, por ejemplo, la captación celular. Los conjugados se pueden enlazar químicamente al nucleótido o a análogos nucleotídicos. Tales conjugados incluyen, pero no se limitan a, restos lipídicos tales como un resto de colesterol (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo hexil-S-tritilol (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., *Bioorg. : Med. Chem. Let.*, 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo dodecanodiol o restos undecílicos (Saison-Behmoaras et al.; *EMBO J.*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantanacético (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654), un resto palmitílico (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237), o un resto hexilamino-carbonil-oxicolesterol u octadecilamina (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 923-937). Numerosas patentes de los Estados Unidos enseñan la preparación de tales conjugados, e incluyen, pero no se limitan a, las patentes U.S. n^{os} 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

Una interacción de Watson-Crick es al menos una interacción con la cara de Watson-Crick de un nucleótido, análogo nucleotídico, o sustituto nucleotídico. La cara de Watson-Crick de un nucleótido, análogo nucleotídico, o sustituto

nucleotídico incluye las posiciones C2, N1 y C6 de un nucleótido, análogo nucleotídico, o sustituto nucleotídico a base de purina, y las posiciones C2, N3 y C4 de un nucleótido, análogo nucleotídico, o sustituto nucleotídico a base de pirimidina.

5 Una interacción de Hoogsteen es la interacción que tiene lugar en la cara de Hoogsteen de un nucleótido o análogo nucleotídico, que está expuesta en la ranura principal de un ADN dúplex. La cara de Hoogsteen incluye la posición N7 y grupos reactivos (NH₂ u O) en la posición C6 de nucleótidos purínicos.

b) Secuencias

10 Hay una variedad de secuencias relacionadas con los genes de CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, CR2-DAF, DAF-CR2, CR2-CD59, CD59-CR2, CR2-CR1, CR1-CR2, CR2-MCP, MCP-CR2, CR2-Crry o Crry-CR2, que tienen, por ejemplo, las secuencias como se describen aquí, o secuencias disponibles en la bibliografía.

15 Una secuencia particular expuesta en SEC ID NO: 25 usada aquí, como un ejemplo, se expone para ejemplificar las composiciones y métodos descritos. Se entiende que la descripción relacionada con esta secuencia es aplicable a cualquier secuencia relacionada con CR2, CR2-DAF, DAF-CR2, CR2-CD59, CD59-CR2, CR2-CR1, CR1-CR2, CR2-MCP, MCP-CR2, CR2-Crry o Crry-CR2, excepto que se indique específicamente de otro modo. Aquellos de pericia en la técnica entenderán cómo resolver discrepancias y diferencias de secuencias, y cómo ajustar las composiciones y métodos que se refieren a una secuencia particular a otras secuencias relacionadas (es decir, secuencias de CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, CR2-DAF, DAF-CR2, CR2-CD59, CD59-CR2, CR2-CR1, CR1-CR2, CR2-MCP, MCP-CR2, CR2-Crry, Crry-CR2). Los cebadores y/o sondas se pueden diseñar para cualquier secuencia de CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, CR2-DAF, DAF-CR2, CR2-CD59, CD59-CR2, CR2-CR1, CR1-CR2, CR2-MCP, MCP-CR2, CR2-Crry o Crry-CR2, dada la información descrita aquí y conocida en la técnica.

3. Suministro de las composiciones a las células

25 Hay un número de composiciones y métodos que se pueden usar para suministrar las presentes composiciones de proteínas de fusión, composiciones de inmunocombinados y composiciones de ácidos nucleicos a células, ya sea in vitro o in vivo. Las composiciones de la invención se administran preferiblemente a un sujeto en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19^a ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995. Típicamente, se usa en la formulación una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para hacer a la formulación isotónica. Los ejemplos de los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, disolución salina, emulsiones de agua:aceite, emulsiones de aceite:agua, y disolución de Ringer y disolución de dextrosa. El pH de la disolución es preferiblemente de alrededor de 5 a alrededor de 8, y más preferiblemente de alrededor de 7 a alrededor de 7,5. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices las cuales están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, liposomas o micropartículas. Será manifiesto para las personas expertas en la técnica que ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y la concentración de anticuerpo que se administra.

35 Las composiciones de la invención se pueden administrar al sujeto, paciente o célula mediante inyección (por ejemplo intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular), o mediante otros métodos tales como infusión, que aseguran su suministro al torrente sanguíneo en una forma eficaz. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

40 Las dosis y calendarios eficaces para administrar las composiciones de la invención se pueden determinar empíricamente, y la realización de tales determinaciones está dentro de la pericia en la técnica. Los expertos en la técnica entenderán que la dosificación de las composiciones de la invención que se deben de administrar variarán dependiendo, por ejemplo, del sujeto que recibirá la composición, de la vía de administración, del tipo particular de composición usada u otros fármacos a administrar. Una dosis diaria típica de las composiciones de la invención usadas solas puede oscilar de alrededor de 1 µg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

a) Sistema de suministro a base de ácidos nucleicos

50 Hay un número de composiciones y métodos que se pueden usar para suministrar ácidos nucleicos a las células, ya sea in vitro o in vivo. Estos métodos y composiciones se pueden dividir enormemente en dos clases: sistemas de suministro a base de virus, y sistemas de suministro no basados en virus. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden suministrar a través de un número de sistemas de suministro directos tales como electroporación, lipofección, precipitación con fosfato de calcio, plásmidos, vectores víricos, ácidos nucleicos víricos, ácidos nucleicos de fagos, fagos, cósmidos, o vía transferencia de material genético en células o vehículos tales como liposomas catiónicos. Los medios apropiados para la transfección, incluyendo vectores víricos, transfectantes químicos o métodos fisicomecánicos tales como electroporación y difusión directa de ADN se describen, por ejemplo, por Wolff, J. A., et al., Science, 247, 1465-1468, (1990); y Wolff, J. A. Nature, 352, 815-818, (1991). Tales métodos son bien conocidos en la técnica y fácilmente adaptables para uso con las composiciones y métodos descritos aquí. En ciertos casos, los métodos se modificarán para funcionar especialmente con grandes moléculas de ADN. Además,

estos métodos se pueden usar para seleccionar como dianas a ciertas enfermedades y poblaciones celulares usando las características de dianización del vehículo.

Los vectores de transferencia pueden ser cualquier construcción nucleotídica usada para suministrar genes a las células (por ejemplo, un plásmido), o como parte de una estrategia general para suministrar genes, por ejemplo como parte de retrovirus o adenovirus recombinante (Ram et al. Cancer Res. 53:83-88, (1993)).

Como se usa aquí, vectores plasmídicos o víricos son agentes que transportan los ácidos nucleicos descritos, tales como SEC ID NO: 25, a la célula sin degradación, e incluyen un promotor que produce la expresión del gen en las células en las que es suministrado. En algunas realizaciones, las CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, CR2-DAF, DAF-CR2, CR2-CD59, CD59-CR2, CR2-CR1, CR1-CR2, CR2-MCP, MCP-CR2, CR2-Crry, o Crry-CR2, se suministran a partir de un virus o un retrovirus. Los vectores víricos son, por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociados, virus de herpes, virus de la vacuna, virus de la polio, virus del SIDA, virus trófico neuronal, virus Sindbis y otros virus de ARN, incluyendo estos virus con la cadena principal del VIH. También se prefieren cualesquiera familias víricas que comparten las propiedades de estos virus que los hacen adecuados para uso como vectores. Los retrovirus incluyen el virus de la leucemia murina de Maloney, MMLV, y retrovirus que expresan las propiedades deseables de MMLV como un vector. Los vectores retrovíricos son capaces de portar una carga genética más grande, es decir, un transgén o gen marcador, que otros vectores víricos, y por esta razón son un vector usado habitualmente. Sin embargo, no son tan útiles en células no proliferantes. Los vectores adenovíricos son relativamente estables y fáciles de trabajar con ellos, tienen títulos elevados, se pueden suministrar en formulación de aerosol, y pueden transfectar a células que no se dividen. Los vectores poxvíricos son grandes y tienen varios sitios para insertar genes, son termoestables, y se pueden almacenar a temperatura ambiente. Una realización preferida es un vector vírico que se ha manipulado mediante ingeniería para suprimir la respuesta inmunitaria del organismo hospedante, provocada por los antígenos víricos. Los vectores preferidos de este tipo poseerán regiones codificantes para interleucina 8 ó 10.

Los vectores víricos pueden tener mayores capacidades de transacción (capacidad para introducir genes) que los métodos químicos o físicos para introducir genes en las células. Típicamente, los vectores víricos contienen genes tempranos no estructurales, genes tardíos estructurales, un transcrito de ARN polimerasa III, repeticiones terminales invertidas necesarias para la replicación y encapsidamiento, y promotores para controlar la transcripción y replicación del genoma vírico. Cuando se manipulan como vectores, los virus tienen típicamente uno o más de los genes tempranos eliminados, y se inserta en el genoma vírico un gen o casete de gen/promotor en lugar del ADN vírico eliminado. Los constructos de este tipo pueden llevar hasta alrededor de 8 kb de material genético extraño. Las funciones necesarias de los genes tempranos eliminados se suministran típicamente por líneas celulares que se han manipulado para expresar los productos génicos de los genes tempranos en trans.

(1) Vectores retrovíricos

Un retrovirus es un virus de animal que pertenece a la familia vírica de Retroviridae, incluyendo cualesquiera tipos, subfamilias, género o tropismos. Los vectores retrovíricos se describen, en general, por Verma, I.M., *Retroviral vectors for gene transfer*. En *Microbiology-1985*, American Society for Microbiology, p. 229-232, Washington, (1985). Los ejemplos de métodos para usar vectores retrovíricos para la terapia génica se describen en las patentes U.S. n^{os} 4.868.116 y 4.980.286; las solicitudes PCT WO 90/02806 y WO 89/07136; y Mulligan, (*Science* 260:926-932 (1993)).

Un retrovirus es esencialmente un empaquetamiento que tiene empaquetado en él una carga de ácido nucleico. La carga de ácido nucleico lleva con ella una señal de empaquetamiento, que asegura que las moléculas hijas replicadas se empaquetarán eficientemente en la cubierta del empaquetamiento. Además de la señal de empaquetamiento, hay un número de moléculas que son necesarias en cis, para la replicación, y el empaquetamiento del virus replicado. Típicamente, un genoma retrovírico contiene los genes gag, pol y env que están implicados en la obtención de la cubierta proteica. Son los genes gag, pol y env que se sustituyen típicamente por el ADN extraño que se va a transferir a la célula diana. Los vectores retrovíricos contienen típicamente una señal de empaquetamiento para la incorporación en la cubierta del empaquetamiento, una secuencia que señala el inicio de la unidad de transcripción gag, elementos necesarios para la transcripción inversa, incluyendo un sitio de unión a cebador para unirse al cebador de ARNt de transcripción inversa, secuencias de repetición terminal que guían el cambio de hebras de ARN durante la síntesis de ADN, una secuencia rica en purina 5' hasta la 3' LTR que sirve como el sitio de cebado para la síntesis de la segunda hebra de la síntesis de ADN, y secuencias específicas cerca de los extremos de las LTRs que permite la inserción del estado de ADN del retrovirus para su inserción en el genoma del hospedante. La eliminación de los genes gag, pol y env permite que se inserte una secuencia extraña de alrededor de 8 kb en el genoma vírico, se transcriba de forma inversa y, al replicarse, se empaquete en una nueva partícula retrovírica. Esta cantidad de ácido nucleico es suficiente para el suministro de uno a muchos genes, dependiendo del tamaño de cada transcrito. Es preferible incluir marcadores seleccionables positivos o negativos junto con otros genes en el inserto.

Puesto que se ha eliminado la maquinaria de replicación y las proteínas de empaquetamiento en la mayoría de los vectores retrovíricos (gag, pol y env), los vectores se generan típicamente colocándolos en una estirpe celular de empaquetamiento. Una estirpe celular de empaquetamiento es una estirpe celular que se ha transfectado o transformado con un retrovirus que contiene la maquinaria de replicación y empaquetamiento, pero carece de

cualquier señal de empaquetamiento. Cuando el vector que posee el ADN de elección se transfecta en estas estirpes celulares, el vector que contiene el gen de interés se replica y se empaqueta en nuevas partículas retrovíricas mediante la maquinaria proporcionada en cis por la célula auxiliar. Los genomas para la maquinaria no están empaquetados debido a que carecen de las señales necesarias.

5 2. Vectores adenovíricos

Se ha descrito la construcción de adenovirus defectuosos en la replicación (Berkner et al., *J. Virology* 61:1213-1220 (1987); Massie et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:2872-2883 (1986); Haj-Ahmad et al., *J. Virology* 57:267-274 (1986); Davidson et al., *J. Virology* 61:1226-1239 (1987); Zhang "Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis" *BioTechniques* 15:868-872 (1993)). El beneficio de usar estos virus como
 10 vectores es que están limitados en el grado en el cual se pueden extender a otros tipos celulares, puesto que se pueden replicar en una célula infectada inicial, pero son incapaces de formar nuevas partículas víricas infecciosas. Se ha demostrado que los adenovirus recombinantes logran una transferencia génica muy eficiente tras el suministro directo in vivo al epitelio de las vías respiratorias, hepatocitos, endotelio vascular, parénquima del SNC, y un número de otros sitios tisulares (Morsy, *J. Clin. Invest.* 92:1580-1586 (1993); Kirshenbaum, *J. Clin. Invest.*
 15 92:381-387 (1993); Roessler, *J. Clin. Invest.* 92:1085-1092 (1993); Moullier, *Nature Genetics* 4:154-159 (1993); La Salle, *Science* 259:988-990 (1993); Gomez-Foix, *J. Biol. Chem.* 267:25129-25134 (1992); Rich, *Human Gene Therapy* 4:461-476 (1993); Zabner, *Nature Genetics* 6:75-83 (1994); Guzman, *Circulation Research* 73:1201-1207 (1993); Bout, *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994); Zabner, *Cell* 75:207-216 (1993); Caillaud, *Eur. J. Neuroscience* 5:1287-1291 (1993); y Ragot, *J. Gen. Virology* 74:501-507 (1993)). Los adenovirus recombinantes logran la transducción génica mediante la unión a receptores de superficies celulares específicos, tras lo cual el virus se internaliza mediante endocitosis mediada por receptores, de la misma manera que el adenovirus de tipo salvaje o defectuoso en la replicación (Chardonnet y Dales, *Virology* 40:462-477 (1970); Brown y Burlingham, *J. Virology* 12:386-396 (1973); Svensson y Persson, *J. Virology* 55:442-449 (1985); Seth, et al., *J. Virol.* 51:650-655 (1984); Seth, et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:1528-1533 (1984); Varga et al., *J. Virology* 65:6061-6070 (1991); Wickham et al., *Cell*
 20 73:309-319 (1993)).

Un vector vírico puede ser aquel basado en un adenovirus al que se le ha eliminado el gen E1, y estos viriones se generan en una estirpe celular tal como la estirpe celular 293 humana. En otra realización preferida, se han eliminado ambos genes E1 y E3 del genoma adenovírico.

(3) Vectores víricos adenoasociados

Otro tipo de vector vírico se basa en un virus adenoasociado (AAV). Este parvovirus defectuoso es un vector preferido debido a que puede infectar muchos tipos celulares y no es patógeno para los seres humanos. Los
 30 vectores del tipo AAV pueden transportar alrededor de 4 a 5 kb, y se sabe que un AAV de tipo salvaje se inserta de forma estable en el cromosoma 19. Se prefieren los vectores que contienen esta propiedad de integración específica del sitio. Una realización especialmente preferida de este tipo de vector es el vector P4.1C producido por Avigen, San Francisco, CA, que puede contener el gen de timidina cinasa del virus del herpes simple, HSV-tk, y/o un gen marcador, tal como el gen que codifica la proteína fluorescente verde, GFP.

En otro tipo de virus AAV, el AAV contiene un par de repeticiones terminales invertidas (ITRs) que flanquean al menos un casete que contiene un promotor que dirige la expresión específica de células operablemente enlazado a un gen heterólogo. Heterólogo en este contexto se refiere a cualquier secuencia nucleotídica o gen que no es nativo al parvovirus AAV o B19.
 40

Típicamente, las regiones codificantes de AAV y B19 se han suprimido, dando como resultado un vector seguro, no citotóxico. Las ITRs de AAV, o sus modificaciones, confieren capacidad infecciosa e integración específica del sitio, pero no citotoxicidad, y el promotor dirige la expresión específica de células. La patente de los Estados Unidos nº 6.261.834 describe material relacionado con el vector de AAV.

45 Los vectores de la presente invención proporcionan así moléculas de ADN que son capaces de integrarse en un cromosoma de mamífero sin toxicidad sustancial.

Los genes insertados en virus y retrovirus contienen habitualmente promotores, y/o potenciadores para ayudar a controlar la expresión del producto génico deseado. Un promotor es generalmente una secuencia o secuencias de ADN que funcionan cuando están en una localización relativamente fija con respecto al sitio de iniciación de la transcripción. Un promotor contiene elementos centrales requeridos para la interacción básica de ARN polimerasa y factores de transcripción, y puede contener elementos en dirección y elementos de respuesta.
 50

(4) Vectores víricos de gran carga

Los experimentos genéticos moleculares con grandes virus del herpes humanos han proporcionado un medio mediante el cual se pueden clonar, propagar y establecer grandes fragmentos de ADN heterólogo en células permisivas para la infección con virus del herpes (Sun et al., *Nature genetics* 8: 33-41, 1994; Cotter y Robertson, *Curr Opin Mol Ther* 5: 633-644, 1999). Estos grandes virus de ADN (el virus del herpes simple (HSV) y el virus de Epstein-Barr (EBV), tienen el potencial de suministrar fragmentos de ADN heterólogo humano > 150 kb a células
 55

específicas. Los recombinantes del EBV pueden mantener grandes trozos de ADN en las células B infectadas como ADN episómico. Los clones individuales portados por insertos genómicos humanos hasta 330 kb parecieron genéticamente estables. El mantenimiento de estos episomas requiere una proteína nuclear de EBV específica, EBNA1, expresada constitutivamente durante la infección con EBV. Adicionalmente, estos vectores se pueden usar para la transfección, en la que se pueden generar transitoriamente *in vitro* grandes cantidades de proteína. Los sistemas de amplicones del virus del herpes también se están usando para empaquetar trozos de ADN > 220 kb y para infectar células que pueden mantener de forma estable ADN como episomas.

Otros sistemas útiles incluyen, por ejemplo, vectores del virus de la vacuna no replicantes restringidos a hospedantes y replicantes.

b) Sistemas no basados en ácidos nucleicos

Las composiciones descritas se pueden suministrar a las células diana de muchas maneras. Por ejemplo, las composiciones se pueden suministrar a través de electroporación, o a través de lipofección, o a través de precipitación con fosfato de calcio. El mecanismo de suministro escogido dependerá en parte del tipo de célula escogida como diana, y de si el suministro se produce, por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*.

De este modo, las composiciones pueden comprender, además de las CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, CR2-DAF, DAF-CR2, CR2-CD59, CD59-CR2, CR2-CR1, CR1-CR2, CR2-MCP, MCP-CR2, CR2-Crry, o Crry-CR2 descritas, o vectores por ejemplo, lípidos tales como liposomas, tales como liposomas catiónicos (por ejemplo, DOTMA, DOPE, DC-colesterol) o liposomas aniónicos. Los liposomas pueden comprender además proteínas para facilitar la selección como diana de una célula particular, si se desea. La administración de una composición que comprende un compuesto y un liposoma catiónico se puede administrar a la sangre aferente, hasta un órgano diana, o se puede inhalar en las vías respiratorias hasta células diana del aparato respiratorio. Con respecto a los liposomas, véanse, por ejemplo, Brigham et al. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 1:95-100 (1989); Felgner et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84:7413-7417 (1987); Patente U.S. n° 4.897.355. Además, el compuesto se puede administrar como un componente de una microcápsula que se puede dirigir hacia tipos celulares específicos, tales como macrófagos, o en los que la difusión del compuesto o suministro del compuesto de la microcápsula se diseña para una tasa o dosificación específica.

En los métodos descritos anteriormente, que incluyen la administración y captación de ADN exógeno en las células de un sujeto (es decir, transducción o transfección génica), el suministro de las composiciones a las células puede ser vía una variedad de mecanismos. Como un ejemplo, el suministro puede ser vía un liposoma, usando preparaciones liposómicas comercialmente disponibles tales como LIPOFECTINA, LIPOFECTAMINA (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como sus liposomas desarrollados según procedimientos estándar en la técnica. Además, el ácido nucleico o vector de esta invención se puede suministrar *in vivo* mediante electroporación, cuya tecnología está disponible de Genetronics, Inc. (San Diego, CA), así como por medio de una máquina de SONOPORATION (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, AZ).

Los materiales pueden estar en disolución, en suspensión (por ejemplo, incorporados en micropartículas, liposomas, o células). Estos se pueden dirigir hacia un tipo celular particular vía anticuerpos, receptores, o ligandos de receptores. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas hacia tejido tumoral (Senter, et al., *Bioconjugate Chem.*, 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., *Br. J. Cancer*, 60:275-281, (1989); Bagshawe, et al., *Br. J. Cancer*, 58:700-703, (1988); Senter, et al., *Bioconjugate Chem.*, 4:3-9, (1993); Battelli, et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 35:421-425, (1992); Pietersz y McKenzie, *Immunolog. Reviews*, 129:57-80, (1992); y Roffler, et al., *Biochem. Pharmacol.*, 42:2062-2065, (1991)). Estas técnicas se pueden usar para una variedad de otros tipos celulares específicos. Los vehículos tales como liposomas "sigilosos" y otros liposomas conjugados a anticuerpos (incluyendo la dianización de carcinomas colónicos por fármacos mediados por lípidos), la dianización mediada por receptores de ADN a través de ligandos específicos de células, la dianización de tumores dirigida por linfocitos, y la dianización retroviral terapéutica muy específica de células de glioma murinas *in vivo*. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas hacia tejido tumoral (Hughes et al., *Cancer Research*, 49:6214-6220, (1989); y Litzinger y Huang, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104:179-187, (1992)). En general, los receptores están implicados en rutas de endocitosis, ya sea constitutiva o inducida por ligandos. Estos receptores se agrupan en canteras revestidas de clatrina, entran a la célula vía vesículas revestidas con clatrina, pasan a través de un endosoma acidificado en el que se clasifican los receptores, y entonces se reciclan a la superficie celular, se almacenan intracelularmente, o se degradan en lisosomas. Las rutas de internalización sirven a una variedad de funciones, tales como la captación de nutrientes, la eliminación de proteínas activadas, el aclaramiento de macromoléculas, la entrada oportunista de virus y toxinas, la disociación y degradación de ligando, y la regulación del nivel de receptor. Muchos receptores siguen más de una ruta intracelular, dependiendo del tipo celular, concentración del receptor, tipo de ligando, valencia del ligando, y concentración del ligando. Se han revisado los mecanismos moleculares y celulares de la endocitosis mediada por receptores (Brown y Greene, *DNA and Cell Biology* 10:6, 399-409 (1991)).

Los ácidos nucleicos que se suministran a las células que se van a integrar en el genoma de las células hospedantes, contienen típicamente secuencias de integración. Estas secuencias son a menudo secuencias

relacionadas con virus, particularmente cuando se usan sistemas a base de virus. Estos sistemas de integración víricos también se pueden incorporar en ácidos nucleicos que se van a suministrar usando un sistema de suministro no basado en ácidos nucleicos, tal como un liposoma, de manera que el ácido nucleico contenido en el sistema de suministro se puede integrar en el genoma del hospedante.

5 Otras técnicas generales para la integración en el genoma del hospedante incluyen, por ejemplo, sistemas diseñados para promover la recombinación homóloga con el genoma del hospedante. Estos sistemas se basan típicamente en la secuencia que flanquea el ácido nucleico a expresar que tiene suficiente homología con una secuencia diana en el genoma de la célula hospedante en el que tiene lugar recombinación entre el ácido nucleico del vector y el ácido nucleico diana, haciendo que el ácido nucleico suministrado se integre en el genoma del hospedante. Estos sistemas y los métodos necesarios para promover la recombinación homóloga son conocidos por los expertos en la técnica.

C) *In vivo/ex vivo*

15 Como se describe anteriormente, las composiciones se pueden administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se pueden suministrar a las células de los sujetos *in vivo* y/o *ex vivo* mediante una variedad de mecanismos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, captación de ADN desnudo, fusión liposómica, inyección intramuscular de ADN vía una pistola génica, endocitosis y similar).

20 Si se emplean métodos *ex vivo*, las células o tejidos se pueden retirar y mantener fuera del cuerpo según protocolos estándar bien conocidos en la técnica. Las composiciones se pueden introducir en las células vía cualquier mecanismo de transferencia génica, tal como, por ejemplo, suministro génico mediado por fosfato de calcio, electroporación, microinyección o proteoliposomas. Las células transducidas se pueden infundir entonces (por ejemplo, en un vehículo farmacéuticamente aceptable) o se pueden transplantar homotópicamente en el sujeto mediante métodos estándar para el tipo celular o de tejido. Se conocen métodos estándar para el trasplante o infusión de diversas células en un sujeto.

4. Sistemas de expresión

25 Los ácidos nucleicos que se suministran a las células contienen típicamente sistemas que controlan la expresión. Por ejemplo, los genes insertados en sistemas víricos y retrovíricos contienen habitualmente promotores y/o potenciadores para ayudar a controlar la expresión del producto génico deseado. Un promotor es generalmente una secuencia o secuencias de ADN que funcionan cuando están en una localización relativamente fija con respecto al sitio de iniciación de la transcripción. Un promotor contiene elementos centrales requeridos para la interacción básica de ARN polimerasa y factores de transcripción, y puede contener elementos en dirección y elementos de respuesta.

a) Promotores y potenciadores víricos

35 Los promotores preferidos que controlan la transcripción procedentes de vectores en células hospedantes de mamífero se pueden obtener a partir de diversas fuentes, por ejemplo los genomas del virus tales como: polioma, virus 40 de simio (SV40), adenovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B, y lo más preferible, citomegalovirus, o procedentes de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo el promotor de beta-actina. Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40, que también contiene el origen de replicación vírico de SV40 (Fiers et al., Nature, 273: 113 (1978)). El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E (Greenway, P.J. et al., Gene 18: 355-360 (1982)). Por supuesto, también son útiles aquí los promotores procedentes de la célula hospedante o especie relacionada.

45 Potenciador se refiere generalmente a una secuencia de ADN que funciona en una distancia no fija desde el sitio de iniciación de la transcripción, y puede estar en 5' (Laimins, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 993 (1981)) o 3' (Lusky, M.L., et al., Mol. Cell Bio. 3: 1108 (1983)) con respecto a la unidad de transcripción. Además, los potenciadores pueden estar en un intrón (Banerji, J.L. et al., Cell 33:729 (1983)) así como en la propia secuencia codificante (Osborne, T.F., et al., Mol. Cell Bio. 4: 1293 (1984)). Habitualmente tienen una longitud entre 10 y 300 pb, y funcionan en cis. Los potenciadores funcionan para incrementar la transcripción a partir de promotores cercanos. Los potenciadores también contienen a menudo elementos de respuesta que median la regulación de la transcripción. Los promotores también pueden contener elementos de respuesta que median la regulación de la transcripción. Los potenciadores determinan a menudo la regulación de la expresión de un gen. Aunque ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína e insulina), típicamente se usará para la expresión general un potenciador procedente de un virus de célula eucariota. Los ejemplos preferidos son el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores adenovíricos.

55 El promotor y/o potenciador se puede activar específicamente mediante luz o sucesos químicos específicos que disparan su función. Los sistemas se pueden regular mediante reactivos tales como tetraciclina y dexametasona.

También hay formas de potenciar la expresión génica de vectores víricos mediante exposición a irradiación, tal como irradiación gamma, o fármacos quimioterapéuticos alquilantes.

5 En ciertas realizaciones, la región promotora y/o potenciadora puede actuar como un promotor y/o potenciador constitutivo para maximizar la expresión de la región de la unidad de transcripción a transcribir. En ciertos constructos, la región promotora y/o potenciadora es activa en todos los tipos celulares eucariotas, incluso si sólo se expresa en un tipo celular particular en un tiempo particular. Un promotor preferido de este tipo es el promotor de CMV (650 bases). Otros promotores preferidos son los promotores SV40, citomegalovirus (promotor de longitud completa), y el vector retrovítico LTF.

10 Se ha demostrado que todos los elementos reguladores específicos se pueden clonar y usar para construir vectores de expresión que son expresados selectivamente en tipos celulares específicos tales como células de melanoma. El promotor de la proteína acética fibrilar glial (GFAP) se ha usado para expresar selectivamente genes en células de origen glial.

15 Los vectores de expresión usados en células hospedantes eucariotas (células de levadura, hongos, de insecto, vegetales, de animales, humanas o células nucleadas) también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción que puede afectar a la expresión de ARNm. Estas regiones se transcriben como segmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica la proteína del factor tisular. Las regiones no traducidas de 3' también incluyen sitios de terminación de la transcripción. Se prefiere que la unidad de transcripción también contenga una región de poliadenilación. Un beneficio de esta región es que incrementa la probabilidad de que la unidad transcrita será procesada y transportada como ARNm. La identificación y uso de
20 señales de poliadenilación en constructos de expresión está bien establecida. Se prefiere que se usen en los constructos transgénicos señales de poliadenilación homólogas. En ciertas unidades de transcripción, la región de poliadenilación deriva de la señal de poliadenilación temprana de SV40, y consiste en alrededor de 400 bases. También se prefiere que las unidades transcritas contengan otras secuencias estándar solas o en combinación con las secuencias anteriores para mejorar la expresión o estabilidad del constructo.

25 b) Marcadores

Los vectores víricos pueden incluir secuencias de ácidos nucleicos que codifican un producto marcador. Este producto marcador se usa para determinar si el gen ha sido suministrado a la célula y, una vez suministrado, está siendo expresado. Los genes marcadores preferidos son el gen lacZ de *E. coli*, que codifica β -galactosidasa, y la proteína fluorescente verde.

30 En algunas realizaciones, el marcador puede ser un marcador seleccionable. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina cinasa, neomicina, análogo de neomicina G418, hidromicina, y puromidina. Cuando tales marcadores seleccionables se transfieren con éxito a una célula hospedante de mamífero, la célula hospedante de mamífero transformada puede sobrevivir si se coloca bajo presión selectiva. Hay dos categorías distintas ampliamente usadas de regímenes selectivos. La primera categoría se basa en un metabolismo de la célula y el uso de una estirpe celular mutante que carece de la capacidad para crecer independiente de un medio suplementado. Dos ejemplos son: células CHO DHFR- y células de ratón LTK-. Estas células carecen de la capacidad para crecer sin la adición de nutrientes tales como timidina o hipoxantina. Debido a que estas células carecen de ciertos genes necesarios para una ruta sintética nucleotídica sintética, no pueden sobrevivir excepto que se proporcionen en un medio suplementado los nucleótidos que faltan.
35 Una alternativa a suplementar los medios es introducir un gen de DHFR o de TK intacto en las células que carecen de los genes respectivos, alterando así sus requisitos de crecimiento. Las células individuales que no se transformaron con el gen de DHFR o de TK no serán capaces de sobrevivir en los medios no suplementados.

40 La segunda categoría es la selección dominante, que se refiere a un esquema de selección usado en cualquier tipo celular y no requiere el uso de una estirpe celular mutante. Estos esquemas usan típicamente un fármaco para detener el crecimiento de la célula hospedante. Estas células que tienen un nuevo gen expresarían una proteína que proporciona resistencia a fármacos, y sobrevivirían a la selección. Los ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina (Southern P. y Berg, P., J. Molec. Appl. Genet. 1: 327 (1982)), ácido micofenólico (Mulligan, R.C. y Berg, P. Science 209: 1422 (1980)) o higromicina, (Sugden, B. et al., Mol. Cell. Biol. 5: 410-413 (1985)). Los tres ejemplos emplean genes bacterianos bajo el control eucariota para proporcionar resistencia al fármaco apropiado G418 o neomicina (genética), xgpt (ácido micofenólico) o higromicina, respectivamente. Otros incluyen el análogo de neomicina G418 y puramicina.
45

50 5. Péptidos

a) Variantes proteicas

55 Como se explica aquí, hay numerosas variantes de la proteína CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, CR2-DAF, DAF-CR2, CR2-CD59, CD59-CR2, CR2-CR1, CR1-CR2, CR2-MCP, MCP-CR2, CR2-Crry, y Crry-CR2, que se conocen y se contemplan aquí. Además, a las variantes de las cepas CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, CR2-DAF, DAF-CR2, CR2-CD59, CD59-CR2, CR2-CR1, CR1-CR2, CR2-MCP, MCP-CR2, CR2-Crry, y Crry-CR2 funcionales conocidas, hay derivados de las proteínas CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, CR2-DAF, DAF-CR2, CR2-CD59,

CD59-CR2, CR2-CR1, CR1-CR2, CR2-MCP, MCP-CR2, CR2-Crry, y Crry-CR2 que también funcionan en los métodos y composiciones descritos. Las variantes proteicas y derivados son bien comprendidos por los expertos en la técnica, y pueden implicar modificaciones de las secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones de secuencias de aminoácidos caen típicamente en una o más de tres clases: variantes sustitucionales, de inserción o de supresión. Las inserciones incluyen fusiones amino y/o carboxil terminales, así como inserciones de intrasecuencias de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Las inserciones normalmente serán inserciones más pequeñas que aquellas de las fusiones amino o carboxil terminales, por ejemplo del orden de uno a cuatro restos. Los derivados proteicos de fusión inmunógena, tales como los descritos en los ejemplos, se obtienen fusionando un polipéptido suficientemente grande para conferir inmunogenicidad a la secuencia diana mediante reticulación in vitro o mediante cultivo celular recombinante transformado con ADN que codifica la fusión. Las supresiones se caracterizan por la eliminación de uno o más restos de aminoácidos de la secuencia proteica. Típicamente, no se eliminan más de alrededor de 2 a 6 restos en cualquier sitio en la molécula proteica. Estas variantes se preparan normalmente mediante mutagénesis específica al sitio de oligonucleótidos en el ADN que codifica la proteína, produciendo de ese modo ADN que codifica la variante, y después expresando el ADN en el cultivo celular recombinante. Las técnicas para obtener mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en ADN que tiene una secuencia conocida son bien conocidos, por ejemplo mutagénesis del cebador M13 y mutagénesis de PCR. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de restos individuales, pero pueden ocurrir en un número de diferentes localizaciones de una sola vez; las inserciones serán habitualmente del orden de alrededor de 1 a 10 restos de aminoácidos; y las supresiones oscilarán de alrededor de 1 a 30 restos. Las supresiones o inserciones se realizan preferiblemente en pares adyacentes, es decir, una supresión de 2 restos o una inserción de 2 restos. Las sustituciones, supresiones, inserciones, o cualquier combinación de las mismas, se pueden combinar para llegar a un constructo final. Las mutaciones no deben colocar la secuencia fuera del marco de lectura, y preferiblemente no crearán regiones complementarias que podrían producir una estructura de ARNm secundaria. Las variantes sustitucionales son aquellas en las que al menos un resto se ha eliminado y se ha insertado un resto diferente en su lugar. Tales sustituciones generalmente se realizan según las siguientes Tablas 1 y 2, y se denominan sustituciones conservativas.

TABLA 1: Abreviaturas de aminoácidos

Aminoácido	Abreviaturas
alanina	Ala A
alsoleucina	Allo
arginina	Arg R
asparagina	Asn N
ácido aspártico	Asp D
cisteína	Cys C
ácido glutámico	Glu E
glutamina	Gln Q
glicina	Gly G
histidina	His H
isoleucina	Ile I
leucina	Leu L
lisina	Lys K
fenilalanina	Phe F
prolina	Pro P
ácido piroglutámico	pGlu
serina	Ser S
treonina	Thr T
tirosina	Tyr Y

Aminoácido	Abreviaturas
triptófano	Trp W
valina	Val V

TABLA 2: Sustituciones de aminoácido
Se conocen en la técnica otras sustituciones conservativas ejemplares de restos originales
Ala; Ser
Arg; Lys; Gln
As; Gln; His
Asp; Glu
Cys; Ser
Gln; Asn; Lys
Glu; Asp
Gly; Pro
His; Asn; Gln
Ile; Leu; Val
Leu; Ile; Val
Lys; Arg; Gln;
Met; Leu; Ile
Phe; Met; Leu; Tyr
Ser; Thr
Thr; Ser
Trp; Tyr
Tyr; Trp; Phe
Val; Ile; Leu

5 Se realizan cambios sustanciales en la función o identidad inmunológica seleccionando sustituciones que son menos conservativas que aquellas en la Tabla 2, es decir, seleccionando restos que difieren más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades proteicas serán aquellas en las que (a) un resto hidrófilo, por ejemplo serilo o treonilo, se sustituye por un resto hidrófobo, por ejemplo leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina es sustituida por cualquier otro resto; (c) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo lisilo, arginilo o histidilo, es sustituido por un resto electronegativo, por ejemplo glutamilo o aspartilo; o (d) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo fenilalanina, es sustituido por uno que no tiene una cadena lateral, por ejemplo glicina en este caso, (e) incrementando el número de sitios para la sulfatación y/o glucosilación.

15 Por ejemplo, la sustitución de un resto de aminoácido por otro que es biológica y/o químicamente similar es conocida por los expertos en la técnica como sustitución conservativa. Por ejemplo, una sustitución conservativa sería sustituir un resto hidrófobo por otro, o un resto polar por otro. Las sustituciones incluyen combinaciones tales como, por ejemplo, Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. Tales variaciones conservativamente sustituidas de cada una de las secuencias descritas explícitamente están incluidas en los polipéptidos mosaico proporcionados aquí.

Para insertar sitios para N-glucosilación (Asn-X-Thr/Ser) u O-glucosilación (Ser o Thr), se puede emplear mutagénesis de sustitución o de supresión. También pueden ser deseables las supresiones de cisteína u otros restos lábiles. Las supresiones o sustituciones de sitios de proteólisis potenciales, por ejemplo Arg, se logra por ejemplo suprimiendo uno de los restos básicos, o sustituyendo uno por restos glutamínico o histidilo.

5 Ciertas derivatizaciones post-traduccionales son el resultado de la acción de células hospedantes recombinantes sobre el polipéptido expresado. Los restos de glutamínico y asparagínico se desamidán frecuentemente de forma post-traducciona a los restos glutamínico y asparagínico correspondientes. Como alternativa, estos restos se desamidán en condiciones suavemente ácidas. Otras modificaciones post-traduccionales incluyen la hidroxilación de prolina y silina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos o-amino de las cadenas laterales de silina, arginina e histidina (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco p. 79-86 [1983]), la acetilación de la amina N-terminal y, en algunos casos, la amidación del carboxilo C-terminal.

15 Se entiende que una forma para definir las variantes y derivados de las proteínas descritas aquí es a través de la definición de las variantes y derivados en términos de homología/identidad con secuencias conocidas específicas. Por ejemplo, SEC ID NO: 26 expone una secuencia particular de CR2 y SEC ID NO: 2 expone una secuencia particular de una proteína DAF. Se describen específicamente variantes de estas y otras proteínas aquí descritas que tienen al menos 70% o 75% u 80% u 85% o 90% o 95% de homología con la secuencia señalada. Los expertos en la técnica entenderán fácilmente cómo determinar la homología de dos proteínas. Por ejemplo, la homología se puede calcular después de alinear las dos secuencias de manera que la homología está en su nivel más elevado.

20 Otra manera de calcular la homología se puede llevar a cabo mediante algoritmos publicados. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación se puede realizar mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda de similitud mediante el método de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

25 Los mismos tipos de homología se pueden obtener para ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante los algoritmos descritos en Zuker, M. Science 244:48-52, 1989, Jaeger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7706-7710, 1989, Jaeger et al. Methods Enzymol. 183:281-306, 1989, que incluyen al menos material relacionado con el alineamiento de ácidos nucleicos.

30 Se entiende que la descripción de mutaciones conservativas y homología se pueden combinar juntos en cualquier combinación, tales como realizaciones que tienen al menos 70% de homología con una secuencia particular en la que las variantes son mutaciones conservativas.

35 Puesto que esta memoria descriptiva explica diversas proteínas y secuencias proteicas, se entiende que también se describen los ácidos nucleicos que codifican esas secuencias proteicas. Esto incluiría todas las secuencias degeneradas relacionadas con una secuencia proteica específica, es decir, todos los ácidos nucleicos que tienen una secuencia que codifica una secuencia proteica particular, así como todos los ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleicos degenerados, que codifican las variantes y derivados descritos de las secuencias proteicas. De este modo, aunque cada secuencia de ácido nucleico particular puede no estar escrita aquí, se entiende que todas y cada una de las secuencias está de hecho descrita y explicada aquí a través de la secuencia proteica descrita. Por ejemplo, una de las muchas secuencias de ácidos nucleicos que pueden codificar la secuencia proteica expuesta en SEC ID NO: 26 se expone en SEC ID NO: 25. Además, por ejemplo, un derivado conservativo descrito de SEC ID NO: 26 se muestra en SEC ID NO: 29, en el que la isoleucina (I) en la posición 9 se cambia a una valina (V). Se entiende que para esta mutación también se describen todas las secuencias de ácidos nucleicos que codifican este derivado particular de cualquiera de las secuencias descritas. También se entiende que aunque ninguna secuencia de aminoácidos indica qué secuencia de ADN particular codifica esa proteína en un organismo, en el que se describen aquí variantes particulares de una proteína descrita, la secuencia de ácido nucleico conocida que codifica esa proteína a partir de la que surge esa proteína es también conocida y se describe y explica aquí.

6. Anticuerpos

50 Un inhibidor del complemento puede ser un anticuerpo anti-C5.

a) Anticuerpos en general

55 El término "anticuerpos" se usa aquí en un sentido amplio, e incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. Además de moléculas de inmunoglobulina intactas, también se incluyen en el término "anticuerpos" los fragmentos o polímeros de esas moléculas inmunoglobulínicas, y versiones humanas o humanizadas de moléculas inmunoglobulínicas o sus fragmentos, como se describe aquí. Los anticuerpos se ensayan en busca de su actividad deseada usando los ensayos *in vitro* descritos aquí, o mediante métodos análogos, después de lo cual sus actividades terapéuticas y/o profilácticas *in vivo* se ensayan según los métodos de ensayo clínicos conocidos.

Como se usa aquí, el término “anticuerpo” engloba, pero no se limita a, inmunoglobulina completa (es decir, un anticuerpo intacto) de cualquier clase. Los anticuerpos nativos son habitualmente glucoproteínas heterotetrámeras, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Típicamente, cada cadena ligera está enlazada a una cadena pesada mediante un enlace de disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces de disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos inmunoglobulínicos. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes de disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V(H)), seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V(L)) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada. Las cadenas ligeras de anticuerpos procedentes de cualquier especie vertebrada se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basado en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, a las inmunoglobulinas se les puede asignar diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo IgG-1, IgG-2, IgG-3, e IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Un experto en la técnica reconocería las clases comparables para ratón. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma, y mu, respectivamente.

El término “variable” se usa aquí para describir ciertas porciones de los dominios variables que difieren en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está habitualmente distribuida de forma uniforme a través de los dominios variables de los anticuerpos. Típicamente está concentrada en tres segmentos denominados regiones que determinan la complementariedad (CDRs) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de las cadenas ligeras como de las cadenas pesadas. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan el marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres CDRs, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDRs en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión de los anticuerpos al antígeno (véase Kabat E. A. et al., “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

La expresión “anticuerpo o sus fragmentos” engloba anticuerpos quiméricos y anticuerpos híbridos, con especificidades antigénicas o epitópicas duales o múltiples, y fragmentos, tales como scFv, sFv, F(ab')₂, Fab', Fab y similares, incluyendo fragmentos híbridos. De este modo, los fragmentos de los anticuerpos pueden retener la capacidad para unirse a sus antígenos específicos. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden mantener la actividad de unión al complemento. Tales anticuerpos y fragmentos se pueden obtener mediante técnicas conocidas en la técnica, y se pueden cribar en busca de especificidad y actividad según los métodos expuestos en los Ejemplos y los métodos generales para producir anticuerpos y el cribado de anticuerpos en busca de especificidad y actividad (véase Harlow y Lane. Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988)).

También están incluidos en el significado de “anticuerpo o fragmentos del mismo” los conjugados de fragmentos de anticuerpos y proteínas de unión a antígeno (anticuerpos monocatenarios) como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. nº 4.704.692.

Como se usa aquí, el término “anticuerpo” o “anticuerpos” también se puede referir a un anticuerpo humano y/o un anticuerpo humanizado. Muchos anticuerpos no humanos (por ejemplo, aquellos derivados de ratones, ratas, o conejos) son naturalmente antigénicos en seres humanos, y de este modo pueden dar lugar a respuestas inmunitarias indeseables cuando se administran a seres humanos. Por lo tanto, el uso de anticuerpos humanos o humanizados en los métodos de la invención sirve para reducir la oportunidad de que un anticuerpo administrado a un ser humano provoque una respuesta inmunitaria indeseable.

Opcionalmente, los anticuerpos se generan en otras especies y se “humanizan” para la administración en seres humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas inmunoglobulínicas o sus fragmentos (tales como Fc, scFv, sFv, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos procedentes de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o del marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno,

y típicamente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de consenso de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante inmunoglobulínica (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)).

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo como restos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable "importado". La humanización se puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo CDRs de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente U.S. n° 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a usar para obtener los anticuerpos humanizados es muy importante a fin de reducir la antigenicidad. Según el método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la librería de secuencias de dominios variables humanas conocidas. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta entonces como el marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993) y Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método usa un marco particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Además es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Hay normalmente modelos inmunoglobulínicos tridimensionales, y son familiares para los expertos en la técnica. Existen programas de ordenador que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias inmunoglobulínicas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia inmunoglobulínica candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de la secuencia de consenso y de importación, de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad incrementada por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de CDR están implicados directamente y muy sustancialmente en la influencia sobre la unión al antígeno (véase el documento WO 94/04679, publicado el 3 de marzo de 1994).

Los fragmentos Fab producidos en la digestión del anticuerpo también contienen los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el término carboxi del dominio de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. El fragmento F(ab')₂ es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab' enlazados mediante un puente de disulfuro en la región bisagra. Fab'-SH es la designación aquí para Fab', en el que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes poseen un grupo tiol libre. Originalmente, los fragmentos de anticuerpos se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

También se proporciona un paratopo inmunógenamente específico aislado o fragmento del anticuerpo. Un epítipo inmunógeno específico del anticuerpo se puede aislar a partir del anticuerpo completo mediante interrupción química o mecánica de la molécula. Los fragmentos purificados así obtenidos se ensayan para determinar su inmunogenicidad y especificidad mediante los métodos enseñados aquí. Opcionalmente, los paratopos inmunorreactivos del anticuerpo se sintetizan directamente. Un fragmento inmunorreactivo se define como una secuencia de aminoácidos de al menos alrededor de dos a cinco aminoácidos consecutivos derivados de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo.

Un método para producir proteínas que comprenden los anticuerpos de la presente invención es enlazar dos o más péptidos o polipéptidos juntos mediante técnicas de química proteica. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos se pueden sintetizar químicamente usando equipo de laboratorio actualmente disponible usando química de Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo) o Boc (terc-butiloxicarbonilo) (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Un experto en la técnica puede apreciar fácilmente que un péptido o polipéptido que corresponde al anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, se puede sintetizar mediante reacciones químicas estándar. Por ejemplo, un péptido o polipéptido se puede sintetizar y no escindir a partir de su resina de síntesis, mientras que el otro fragmento de un

anticuerpo se puede sintetizar y subsiguientemente escindir de la resina, exponiendo de ese modo un grupo terminal que está funcionalmente bloqueado en el otro fragmento. Mediante reacciones de condensación de péptidos, estos dos fragmentos se pueden unir covalentemente vía un enlace peptídico en sus términos carboxilo y amino, respectivamente, para formar un anticuerpo, o fragmento del mismo (Grant GA (1992) *Synthetic Peptides: A User Guide*. W.H. Freeman y Co., N.Y. (1992); Bodansky M y Trost B., Ed. (1993) *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc., NY). Como alternativa, el péptido o polipéptido se sintetiza independientemente in vivo como se describe anteriormente. Una vez aislados, estos péptidos o polipéptidos independientes se pueden enlazar para formar un anticuerpo o fragmento del mismo vía reacciones de condensación de péptidos similares.

Por ejemplo, una ligación enzimática de segmentos peptídicos clonados o sintéticos permite que fragmentos peptídicos relativamente cortos se unan para producir fragmentos peptídicos más grandes, polipéptidos o dominios proteicos completos (Abrahmsen L et al., *Biochemistry*, 30:4151 (1991)). Como alternativa, la ligación química nativa de péptidos sintéticos se puede utilizar para construir sintéticamente péptidos o polipéptidos grandes a partir de fragmentos peptídicos más cortos. Este método consiste en una reacción química de dos etapas (Dawson et al. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science*, 266:776-779 (1994)). La primera etapa es la reacción quimioselectiva de un alfa-tioéster de péptido sintético sin proteger con otro segmento peptídico sin proteger que contiene un resto Cys aminoterminal para dar un intermedio enlazado a tioéster como el producto covalente inicial. Sin un cambio en las condiciones de reacción, este intermedio sufre una reacción intramolecular rápida y espontánea para formar un enlace peptídico nativo en el sitio de ligación. La aplicación de este método de ligación química nativa a la síntesis total de una molécula proteica se ilustra mediante la preparación de interleucina 8 (IL-8) humana (Baggiolini M et al. (1992) *FEBS Lett.* 307:97-101; Clark-Lewis I et al., *J. Biol. Chem.*, 269:16075 (1994); Clark-Lewis I et al., *Biochemistry*, 30:3128 (1991); Rajarathnam K et al., *Biochemistry* 33:6623-30 (1994)).

Como alternativa, los segmentos peptídicos sin proteger están enlazados químicamente, en los que el enlace formado entre los segmentos peptídicos como resultado de la ligación química es un enlace no natural (no peptídico) (Schnolzer, M et al. *Science*, 256:221 (1992)). Esta técnica se ha usado para sintetizar análogos de dominios proteicos, así como grandes cantidades de proteínas relativamente puras con actividad biológica completa (deLisle Milton RC et al., *Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press, Nueva York, p. 257-267 (1992)).

Los fragmentos polipeptídicos de la presente invención pueden ser proteínas recombinantes obtenidas clonando ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un sistema de expresión capaz de producir los fragmentos polipeptídicos del mismo, tales como un sistema de expresión adenovírico o baculovírico. Por ejemplo, se puede determinar el dominio activo de un anticuerpo a partir de un hibridoma específico que puede provocar un efecto biológico asociado con la interacción del anticuerpo con un receptor Fc. Por ejemplo, los aminoácidos que se encuentra que no contribuyen ni a la actividad ni a la especificidad de unión o afinidad del anticuerpo se pueden suprimir sin una pérdida en la actividad respectiva. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los aminoácidos amino o carboxi-terminales se eliminan secuencialmente de la molécula no inmunoglobulínica o de la molécula inmunoglobulínica nativas o modificadas, y la actividad respectiva se evalúa en uno de los muchos ensayos disponibles. En otro ejemplo, un fragmento de un anticuerpo comprende un anticuerpo modificado en el que al menos un aminoácido se ha sustituido por el aminoácido de origen natural en una posición específica, y una porción de los aminoácidos aminoterminal o carboxiterminal, o incluso una región interna del anticuerpo, se ha sustituido por un fragmento polipeptídico u otro resto, tal como biotina, que puede facilitar la purificación del anticuerpo modificado.

Los fragmentos, ya sea que estén unidos a otras secuencias o no, incluyen inserciones, supresiones, sustituciones, u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o restos de aminoácidos específicos, con la condición de que la actividad del fragmento no se vea alterada o impedida significativamente en comparación con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no modificado. Estas modificaciones pueden proporcionar alguna propiedad adicional, tal como para eliminar o añadir aminoácidos capaces de enlazamiento de disulfuro, para incrementar su biolnguevidad, para alterar sus características secretoras, etc. En cualquier caso, el fragmento debe poseer una propiedad bioactiva, tal como actividad de unión, regulación de unión en el dominio de unión, etc. Las regiones funcionales o activas del anticuerpo se pueden identificar mediante mutagénesis de una región específica de la proteína, seguido de la expresión y ensayo del polipéptido expresado.

Tales métodos son fácilmente manifiestos para un practicante experto en la técnica, y pueden incluir mutagénesis específica del sitio del ácido nucleico que codifica el antígeno (Zoller MJ et al. *Nucl. Acids Res.* 10:6487-500 (1982)).

Para seleccionar anticuerpos que se unen selectivamente con una proteína particular, variante, o fragmento, se puede usar una variedad de formatos de inmunoensayos. Por ejemplo, habitualmente se usan inmunoensayos de ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos selectivamente inmunorreactivos con una proteína, variante proteica, o fragmento de la misma. Véase Harlow y Lane. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988), para una descripción de formatos de inmunoensayos y condiciones que se podrían usar para determinar la unión selectiva. La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Un kit de reactivo de anticuerpo puede comprender recipientes del anticuerpo monoclonal o su fragmento y uno o más reactivos para detectar la unión del anticuerpo o su fragmento a la molécula del receptor Fc. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, u otros marcadores. Los reactivos

también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios, o reactivos para reacciones enzimáticas, en las que las reacciones enzimáticas producen un producto que se puede visualizar.

b) Anticuerpos humanos

5 Los anticuerpos humanos de la invención se pueden preparar usando cualquier técnica. Los ejemplos de técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos incluyen las descritas por Cole et al. (*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77, 1985) y por Boerner et al. (*J. Immunol.*, 147(1):86-95, 1991). Los anticuerpos humanos de la invención (y sus fragmentos) también se pueden producir usando librerías de presentación de fagos (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581, 1991).

10 Los anticuerpos humanos de la invención también se pueden obtener a partir de animales transgénicos. Por ejemplo, se han descrito ratones mutantes transgénicos que son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en respuesta a la inmunización (véanse, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-2555 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993)). Específicamente, la supresión homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J(H)) en estos ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno, y la transferencia con éxito de la matriz del gen de anticuerpo de línea germinal humano en tales ratones mutantes de línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos con la exposición al antígeno. Los anticuerpos que tienen la actividad deseada se seleccionan usando complejos de co-receptor de Env-CD4 como se describen aquí.

c) Administración de anticuerpos

20 Los anticuerpos de la invención se administran preferiblemente a un sujeto en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (19ª ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995. Típicamente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer a la formulación isotónica. Los ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen, pero no se limitan a, disolución salina, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. El pH de la disolución es preferiblemente de alrededor de 5 a alrededor de 8, y más preferiblemente de alrededor de 7 a alrededor de 7,5. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación sostenida, tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices las cuales están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, liposomas o micropartículas. Será manifiesto para los expertos en la técnica que ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y concentración de anticuerpo a administrar.

Los anticuerpos se pueden administrar al sujeto, paciente o célula mediante inyección (por ejemplo intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular), o mediante otros métodos tales como infusión, que aseguren su suministro al torrente sanguíneo en una forma eficaz. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

35 Las dosis eficaces y programas para administrar los anticuerpos se pueden determinar empíricamente, y la obtención de tales determinaciones está dentro de la pericia en la técnica. Los expertos en la técnica entenderán que la dosificación de anticuerpos que se debe de administrar variará dependiendo de, por ejemplo, el sujeto que recibirá el anticuerpo, la vía de administración, el tipo particular de anticuerpo usado, y otros fármacos administrados. La guía para seleccionar dosis apropiadas para anticuerpos se encuentra en la bibliografía sobre usos terapéuticos de anticuerpos, por ejemplo *Handbook of Monoclonal Antibodies*, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., (1985) capítulo 22 y p. 303-357; Smith et al., *Antibodies in Human Diagnosis and Therapy*, Haber et al., eds., Raven Press, Nueva York (1977) p. 365-389. Una dosis diaria típica del anticuerpo usado solo puede oscilar de alrededor de 1 µg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

45 Tras la administración de un anticuerpo para tratar, inhibir o prevenir una infección por VIH, la eficacia del anticuerpo terapéutico se puede evaluar de diversas maneras bien conocidas por el experto. Por ejemplo, un experto normal en la técnica entenderá que un anticuerpo de la invención es eficaz para tratar o inhibir una infección por VIH en un sujeto observando que el anticuerpo reduce la carga viral o evita un incremento adicional en la carga viral. Las cargas virales se pueden medir mediante métodos que son conocidos en la técnica, por ejemplo usando ensayos de reacción en cadena de la polimerasa para detectar la presencia de ácido nucleico de VIH, o ensayos de anticuerpos para detectar la presencia de proteína de VIH en una muestra (por ejemplo, pero sin limitarse a, sangre) de un sujeto o paciente, o midiendo el nivel de niveles de anticuerpos anti-VIH circulante en el paciente. La eficacia del tratamiento con anticuerpos también se puede determinar midiendo el número de células T CD4⁺ en el sujeto infectado con VIH. Un tratamiento con anticuerpos que inhiba una disminución inicial o adicional en células T CD4⁺ en un sujeto o paciente positivo a VIH, o que dé como resultado un incremento en el número de células T CD4⁺ en el sujeto positivo a VIH, es un tratamiento con anticuerpos eficaz.

d) Enfoques de ácidos nucleicos para el suministro de anticuerpos

Las composiciones de la invención también se pueden administrar a pacientes o sujetos como una preparación de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN o ARN) que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, de manera que las

propias células del paciente o del sujeto captan el ácido nucleico y producen y segregan la composición codificada (por ejemplo, CR2-DAF, DAF-CR2, CR2-CD59, CD59-CR2, CR2-CR1, CR1-CR2, CR2-MCP, MCP-CR2, CR2-Crry, o Crry-CR2).

e) Suministro de ácidos nucleicos

5 En los métodos descritos anteriormente, que incluyen la administración y captación de ADN exógeno en las células de un sujeto (es decir, la transducción o transfección génica), los ácidos nucleicos de la presente invención pueden estar en forma de ADN o ARN desnudo, o los ácidos nucleicos pueden estar en un vector para suministrar los ácidos nucleicos a las células, con lo que el fragmento de ADN que codifica el anticuerpo está bajo la regulación transcripcional de un promotor, como entendería muy bien un experto normal en la técnica. El vector puede ser una preparación comercialmente disponible, tal como un vector adenovirico (Quantum Biotechnologies, Inc. (Laval, Quebec, Canadá). El suministro del ácido nucleico o vector a las células puede ser vía una variedad de mecanismos. Como ejemplo, el suministro puede ser vía un liposoma, usando preparaciones liposómicas comercialmente disponibles tales como LIPOFECTINA, LIPOFECTAMINA (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como otros liposomas desarrollados según procedimientos estándar en la técnica. Además, el ácido nucleico o vector de esta invención se puede suministrar *in vivo* mediante electroporación, cuya tecnología está disponible de Genetronics, Inc. (San Diego, CA), así como por medio de una máquina de SONOPORACIÓN (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, AZ).

20 Como ejemplo, el suministro del vector puede ser vía un sistema vírico, tal como un sistema de vector retrovírico que puede empaquetar un genoma retrovírico recombinante (véanse, por ejemplo, Pastan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:4486, 1988; Miller et al., Mol. Cell. Biol. 6:2895, 1986). El retrovirus recombinante se puede usar entonces para infectar y de ese modo suministrar a las células infectadas ácido nucleico que codifica un anticuerpo ampliamente neutralizante (o fragmento activo del mismo) de la invención. El método exacto de introducir el ácido nucleico alterado en células de mamífero no está limitado por supuesto al uso de vectores retrovíricos. Existen ampliamente otras técnicas para este procedimiento, incluyendo el uso de vectores adenoviricos (Mitani et al., Hum. Gene Ther. 5:941-948, 1994), vectores víricos adeno-asociados (AAV) (Goodman et al., Blood 84:1492-1500, 1994), vectores lentiviricos (Naidini et al., Science 272:263-267, 1996), vectores retrovíricos pseudotipados (Agrawal et al., Exper. Hematol. 24:738-747, 1996). También se pueden usar técnicas de transducción física, tales como el suministro de liposomas y mecanismos mediados por receptores y otros mecanismos de endocitosis (véase, por ejemplo, Schwartzberger et al., Blood 87:472-478, 1996). Esta invención se puede usar juntamente con cualquiera de estos u otros métodos de transferencia génica usados habitualmente.

35 Como ejemplo, si el ácido nucleico de la invención que codifica el constructo modulador del complemento se suministra a las células de un sujeto en un vector adenovirico, la dosis para la administración de adenovirus a seres humanos puede oscilar de alrededor de 10^7 a alrededor de 10^9 unidades formadoras de placas (pfu) por inyección, pero puede ser tan alta como 10^{12} pfu por inyección (Crystal, Hum. Gene Ther. 8:985-1001, 1997; Alvarez y Curiel, Hum. Gene Ther. 8:597-613, 1997). Un sujeto puede recibir una única inyección, o, si son necesarias inyecciones adicionales, se pueden repetir a intervalos de seis meses (u otros intervalos de tiempo apropiados, según lo determine el experto) durante un período indefinido y/o hasta que se ha establecido la eficacia del tratamiento.

40 La administración parenteral del ácido nucleico o vector de la presente invención, si se usa, está generalmente caracterizada por inyección. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la disolución de la suspensión en un líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Un enfoque más recientemente revisado para la administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de manera que se mantenga una dosis constante. Véase, por ejemplo, la patente U.S. 3.610.795. Para una explicación adicional de formulaciones adecuadas y diversas vías de administración de compuestos terapéuticos, véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19^a ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995.

7. Vehículos farmacéuticos/suministro de productos farmacéuticos

50 Como se describe anteriormente, las composiciones también se pueden administrar *in vivo* en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "farmacéuticamente aceptable" se quiere decir un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material se puede administrar a un sujeto, junto con el ácido nucleico o vector, sin provocar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. El vehículo se seleccionaría naturalmente para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo y para minimizar cualesquiera efectos secundarios adversos en el sujeto, como sería bien conocido por un experto en la técnica.

55 Las composiciones se pueden administrar oralmente, parenteralmente (por ejemplo intravenosamente), mediante inyección intramuscular, mediante inyección intraperitoneal, transdérmicamente, extracorpóreamente, tópicamente, o similar, aunque se prefiere típicamente la administración intranasal tópica o la administración mediante inhalante. Como se usa aquí, "administración intranasal tópica" significa el suministro de las composiciones en los conductos nasal y en la nariz a través de una o de ambas fosas nasales, y puede comprender el suministro mediante un

mecanismo de pulverización o mecanismo de gotita, o a través de aerosolización del ácido nucleico o vector. Esto último es eficaz cuando se van a tratar simultáneamente un gran número de animales. La administración de las composiciones mediante inhalante puede ser a través de la nariz o la boca vía el suministro mediante un mecanismo de pulverización o de gotita. El suministro también puede ser directamente a cualquier área del sistema respiratorio (por ejemplo, pulmones) vía intubación. La cantidad exacta de las composiciones requeridas variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad, peso y estado general del sujeto, de la gravedad del trastorno alérgico que se trate, del ácido nucleico o vector particular usado, su modo de administración, y similar. De este modo, no es posible especificar una cantidad exacta para cada composición. Sin embargo, un experto normal en la técnica puede determinar una cantidad apropiada usando solamente experimentación habitual dadas las enseñanzas aquí.

La administración parenteral de la composición, si se usa, está generalmente caracterizada por inyección. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para disolución de la suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Un enfoque más recientemente revisado para administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, de manera que se mantenga una dosis constante. Véase, por ejemplo, la patente U.S. 3.610.795.

Los materiales pueden estar en disolución, en suspensión (por ejemplo, incorporados en micropartículas, liposomas, o células). Estos se pueden dirigir hacia un tipo celular particular vía anticuerpos, receptores, o ligandos de receptores. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas hacia tejido tumoral (Senter, et al., *Bioconjugate Chem.*, 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., *Br. J. Cancer*, 60:275-281, (1989); Bagshawe, et al., *Br. J. Cancer*, 58:700-703, (1988); Senter, et al., *Bioconjugate Chem.*, 4:3-9, (1993); Battelli, et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 35:421-425, (1992); Pietersz y McKenzie, *Immunolog. Reviews*, 129:57-80, (1992); y Roffler, et al., *Biochem. Pharmacol.*, 42:2062-2065, (1991)). Los vehículos tales como liposomas "sigilosos" y otros liposomas conjugados a anticuerpos (incluyendo la dianización de fármacos mediados por lípidos a carcinoma colónico), la dianización de ADN mediada por receptores a través de ligandos específicos de las células, la dianización de tumores dirigida por linfocitos, y la dianización retroviral terapéutica muy específica de células de glioma murino *in vivo*. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas hacia tejido tumoral (Hughes et al., *Cancer Research*, 49:6214-6220, (1989); y Litzinger y Huang, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104:179-187, (1992)). En general, los receptores están implicados en rutas de endocitosis, ya sea constitutiva o inducida por ligandos. Estos receptores se agrupan en canteras revestidas de clatrina, entran en la célula vía vesículas revestidas con clatrina, pasan a través de un endosoma acidificado en el que se clasifican los receptores, y entonces se reciclan a la superficie celular, se almacenan intracelularmente, o se degradan en lisosomas. Las rutas de internalización sirven a una variedad de funciones, tales como la captación de nutrientes, eliminación de proteínas activadas, aclaramiento de macromoléculas, entrada oportunista de virus y toxinas, disociación y degradación de ligando, y regulación del nivel de receptores. Muchos receptores siguen más de una ruta intracelular, dependiendo del tipo celular, de la concentración del receptor, del tipo de ligando, de la valencia del ligando, y de la concentración del ligando. Se han repasado los mecanismos moleculares y celulares de la endocitosis mediada por receptores (Brown y Greene, *DNA and Cell Biology* 10:6, 399-409 (1991)).

a) Vehículos farmacéuticamente aceptables

Las composiciones, incluyendo anticuerpos, se pueden usar terapéuticamente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los vehículos farmacéuticos son conocidos por los expertos en la técnica. Estos serían muy típicamente vehículos estándar para la administración de fármacos a seres humanos, incluyendo disoluciones tales como agua estéril, disolución salina, y disoluciones tamponadas a pH fisiológico. Las composiciones se pueden administrar intramuscularmente o subcutáneamente. Otros compuestos se administrarán según procedimientos estándar usados por los expertos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensoactivos, y similares, además de la molécula de elección. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más ingredientes activos, tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos, y similares.

La composición farmacéutica se puede administrar de muchas maneras, dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico, y del área a tratar. La administración puede ser tópicamente (incluyendo oftálmicamente, vaginalmente, rectalmente, intranasalmente), oralmente, mediante inhalación, o parenteralmente, por ejemplo mediante goteo intravenoso, inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Los anticuerpos descritos se pueden administrar intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutáneamente, intracavidad, o transdérmicamente.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo disolución salina y medios

5 tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactado, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y de nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares.

Las formulaciones para administración tópica pueden incluir ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes, y similares.

10 Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o disoluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sellos, o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, saborizantes, diluyentes, emulsionantes, auxiliares de la dispersión o aglutinantes.

15 Algunas de las composiciones se pueden administrar como una sal de adición de ácidos o de bases farmacéuticamente aceptable, formada mediante reacción con ácidos orgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico, y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, y ácido fumárico, o mediante reacción con una base inorgánica tal como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, y bases orgánicas tales como mono-, di-, trialkil y arilaminas, y etanolaminas sustituidas.

b) Usos terapéuticos

20 Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son aquellos suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el que se ven afectados los síntomas del trastorno. La dosis no sería tan grande como para provocar efectos secundarios adversos, tal como reacciones cruzadas indeseadas, reacciones anafilácticas, y similares. Generalmente, la dosis variará con la edad, estado, sexo y grado de la enfermedad en el paciente, y puede ser determinada por un experto en la técnica. La dosis se puede ajustar por el médico individual en el caso de contraindicaciones. La dosis puede variar, y se puede administrar en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días.

8. Medios legibles por ordenador

30 Se entiende que los ácidos nucleicos y proteínas descritos se pueden representar como una secuencia que consiste en los nucleótidos de aminoácidos. Hay muchas maneras para presentar estas secuencias, por ejemplo el nucleótido guanosa se puede representar por G o g. Igualmente, el aminoácido valina se puede representar por Val o V. Los expertos en la técnica entienden cómo presentar y expresar cualquier secuencia de ácido nucleico o proteica en cualquiera de las diversas formas que existen, considerándose descrita aquí cada una de ellas. Se contempla específicamente aquí la presentación de estas secuencias en medios legibles por ordenador, tales como disquetes, cintas, chips, discos duros, discos compactos y discos de vídeo, comercialmente disponibles, u otros medios legibles por ordenador. También se describen las representaciones de código binario de las secuencias descritas. Los expertos en la técnica entienden qué medios legibles por ordenador. De este modo, los medios legibles por ordenador en los que se registran, almacenan o guardan las secuencias proteicas o ácidos nucleicos.

9. Composiciones identificadas mediante cribado con composiciones descritas

a) Diseño de fármacos asistido por ordenador

40 Las composiciones descritas se pueden usar como dianas para cualquier técnica de formación de modelos moleculares para identificar la estructura de las composiciones descritas o para identificar moléculas potenciales o reales, tales como pequeñas moléculas, que interactúan de una manera deseada con las composiciones descritas. Los ácidos nucleicos, péptidos, y moléculas relacionadas descritos aquí se pueden usar como dianas en cualquier programa o enfoque de formación de modelos moleculares.

45 Se entiende que cuando se usan las composiciones descritas en técnicas de formación de modelos, se identificarán moléculas, tales como moléculas macromoleculares, que tienen propiedades deseadas particulares tales como inhibición o estimulación o la función de la molécula diana. También se describen las moléculas identificadas y aisladas cuando se usan las composiciones descritas, tales como CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, CR2-DAF, DAF-CR2, CR2-CD59, CD59-CR2, CR2-CR1, CR1-CR2, CR2-MCP, MCP-CR2 o CR2-Crry, Crry-CR2. De este modo, los productos producidos usando los enfoques de formación de modelos moleculares que implican las composiciones descritas, tales como CR2, DAF, CD59, CR1, MCP, Crry, CR2-DAF, DAF-CR2, CR2-CD59, CD59-CR2, CR2-CR1, CR1-CR2, CR2-MCP, MCP-CR2, CR2-Crry o Crry-CR2, también se consideran aquí descritos.

55 De este modo, una forma de aislar moléculas que se unen a una molécula de elección es a través de un diseño racional. Esto se logra mediante información estructural y formación de modelos por ordenador. La tecnología de formación de modelos por ordenador permite la visualización de la estructura atómica tridimensional de una molécula seleccionada, y el diseño racional de nuevos compuestos que interactuarán con la molécula. El

5 constructo tridimensional depende típicamente de datos procedentes de análisis cristalográficos de rayos X o formación de imágenes mediante RMN de la molécula seleccionada. La dinámica molecular requiere datos de campos de fuerza. Los sistemas gráficos por ordenador permiten la predicción de cómo un nuevo compuesto se enlazar

10 Los ejemplos de sistemas de formación de modelos moleculares son los programas CHARMM y QUANTA, Polygen Corporation, Waltham, MA. CHARMM realiza las funciones de dinámica molecular y minimización de energía. QUANTA realiza la construcción, formación de modelos gráficos y el análisis de la estructura molecular. QUANTA permite la construcción interactiva, modificación, visualización y análisis del comportamiento de las moléculas entre sí.

15 Un número de artículos repasa la formación de modelos por ordenador de fármacos que interactúan con proteínas específicas, tales como Rotivinen, et al., 1988 Acta Pharmaceutica Fennica 97, 159-166; Ripka, New Scientist 54-57 (16 de junio, 1988); McKinaly y Rossmann, 1989 Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 111-122; Perry y Davies, QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design p. 189-193 (Alan R. Liss, Inc. 1989); Lewis y Dean, 1989 Proc. R. Soc. Lond. 236, 125-140 y 141-162; y, con respecto a una enzima modelo para componentes de ácidos nucleicos, Askew, et al., 1989 J. Am. Chem. Soc. 111, 1082-1090. Otros programas de ordenador que criban y representan gráficamente compuestos químicos están disponibles de compañías tales como BioDesign, Inc., Pasadena, CA., Allelix, Inc, Mississauga, Ontario, Canadá, e Hypercube, Inc., Cambridge, Ontario. Aunque estos se diseñan principalmente para la aplicación a fármacos específicos para proteínas particulares, se pueden adaptar para diseñar moléculas que interactúan específicamente con regiones específicas de ADN o ARN, una vez que se identifica esa región.

25 Aunque descrito anteriormente con referencia al diseño y generación de compuestos que podrían alterar la unión, también se podrían cribar librerías de compuestos conocidos, incluyendo productos naturales y compuestos químicos sintéticos, y materiales biológicamente activos, incluyendo proteínas, para compuestos que alteran la unión al sustrato o la actividad enzimática.

10. Kits

30 Se describen aquí kits que se obtienen para reactivos que se pueden usar en la práctica de los métodos descritos aquí. Los kits pueden incluir cualquier reactivo o composición de reactivos explicados aquí o que se entendería que se necesitan o son beneficiosos en la práctica de los métodos descritos. Por ejemplo, los kits podrían incluir cebadores para llevar a cabo las reacciones de amplificación explicadas en ciertas realizaciones de los métodos, así como los tampones y enzimas requeridos para usar los cebadores como se pretende. Por ejemplo, se describe un kit para evaluar el riesgo de un sujeto al cáncer, asma, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis reactiva, espondiloartritis, vasculitis sistémica, diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica experimental, síndrome de Sjögren, enfermedad de hospedante frente a injerto, enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lesión por reperfusión isquémica, infarto de miocardio, enfermedad de Alzheimer, rechazo de trasplantes (alógeno y xenogénico), trauma térmico, cualquier inflamación inducida por complejo inmunitario, glomerulonefritis, miastenia grave, esclerosis múltiple, lupus cerebral, síndrome de Guillain-Barre, vasculitis, esclerosis sistémica, anafilaxis, reacciones al catéter, ateroma, infertilidad, tiroiditis, ARDS, síndrome de post-bypass, hemodiálisis, reumatoide juvenil, síndrome de Behcet, anemia hemolítica, pénfigo, penfigoide ampolloso, apoplejía, aterosclerosis, y esclerodermia.

E. Métodos para obtener las composiciones

45 Las composiciones descritas aquí y las composiciones necesarias para llevar a cabo los métodos descritos se pueden obtener usando cualquier método conocido por los expertos en la técnica para ese reactivo o compuesto particular, excepto que se señale específicamente de otro modo.

50 Se describen métodos para obtener una composición que comprende un constructo, en los que el constructo comprende CR2 y un modulador del complemento. También se describen métodos para obtener una composición, en los que la composición es la composición de la invención.

1. Síntesis peptídica

55 Un método para producir las proteínas descritas, tales como SEC ID NO: 6, es enlazar juntos dos o más péptidos o polipéptidos mediante técnicas de química de proteínas. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos se pueden sintetizar químicamente usando equipo de laboratorio actualmente disponible usando química de Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) o de Boc (*tert*-butiloxycarbonilo) (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Un experto en la técnica puede apreciar fácilmente que un péptido o polipéptido que corresponde a las proteínas descritas, por ejemplo, se puede sintetizar mediante reacciones químicas estándar. Por ejemplo, un péptido o polipéptido se puede sintetizar y no escindir de su resina de síntesis, mientras que el otro fragmento de un péptido o proteína se puede

5 sintetizar y escindir subsiguientemente de la resina, exponiendo de ese modo un grupo terminal que está funcionalmente bloqueado en el otro fragmento. Mediante reacciones de condensación de péptidos, estos dos fragmentos se pueden unir covalentemente vía un enlace peptídico en sus términos carboxilo y amino, respectivamente, para formar un anticuerpo, o fragmento del mismo (Grant GA (1992) *Synthetic Peptides: A User Guide*. W.H. Freeman y Co., N.Y. (1992); Bodansky M y Trost B., Ed. (1993) *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc., NY) (que incluye material relacionado con la síntesis de péptidos). Como alternativa, el péptido o polipéptido se sintetiza independientemente *in vivo* como se describe aquí. Una vez aislados, estos péptidos o polipéptidos independientes se pueden enlazar para formar un péptido o fragmento del mismo vía reacciones de condensación de péptidos similares.

10 Por ejemplo, la ligación enzimática de segmentos peptídicos clonados o sintéticos permite que se unan fragmentos peptídicos relativamente cortos para producir fragmentos peptídicos más grandes, polipéptidos o dominios proteicos completos (Abrahmsen L et al., *Biochemistry*, 30:4151 (1991)). Como alternativa, la ligación química nativa de péptidos sintéticos se puede utilizar para construir sintéticamente grandes péptidos o polipéptidos a partir de fragmentos peptídicos más cortos. Este método consiste en una reacción química de dos etapas (Dawson et al. 15 *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science*, 266:776-779 (1994)). La primera etapa es la reacción quimioselectiva de un tioéster de péptido sintético sin proteger con otro segmento peptídico sin proteger que contiene un resto Cys aminoterminal para dar un intermedio enlazado con tioéster como producto covalente inicial. Sin un cambio en las condiciones de reacción, este intermedio sufre una reacción intramolecular espontánea y rápida para formar un enlace peptídico nativo en el sitio de ligación (Baggiolini M et al. (1992) *FEBS Lett.* 307:97-101; Clark-Lewis I et al., *J. Biol. Chem.*, 269:16075 (1994); Clark-Lewis I et al., *Biochemistry*, 30:3128 (1991); 20 Rajarathnam K et al., *Biochemistry* 33:6623-30 (1994)).

Como alternativa, los segmentos peptídicos sin proteger están enlazados químicamente, en los que el enlace formado entre los segmentos peptídicos como resultado de la ligación química es un enlace no natural (no peptídico) (Schnolzer, M et al. *Science*, 256:221 (1992)). Esta técnica se ha usado para sintetizar análogos de dominios proteicos, así como grandes cantidades de proteínas relativamente puras con actividad biológica completa (deLisle Milton RC et al., *Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press, Nueva York, p. 257-267 (1992)). 25

2. Procedimiento para obtener las composiciones

30 Se describen procedimientos para obtener las composiciones, así como para obtener los intermedios que conducen a las composiciones. Por ejemplo, se describen ácidos nucleicos en las SEC ID NO: 5. Hay una variedad de métodos que se pueden usar para obtener estas composiciones, tales como métodos químicos sintéticos y métodos de biología molecular estándar. Se entiende que los métodos para obtener estas y las otras composiciones descritas se describen específicamente.

35 Se describen moléculas de ácido nucleico producidas mediante el procedimiento que comprende enlazar de manera operativa un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEC ID NO: 25 y una secuencia que controla la expresión del ácido nucleico.

También se describen moléculas de ácido nucleico producidas mediante el procedimiento que comprende enlazar de manera operativa una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene 80% de identidad con una secuencia expuesta en SEC ID NO: 25, y una secuencia que controla la expresión del ácido nucleico.

40 Se describen animales no humanos producidos mediante el procedimiento de transfectar una célula en el animal con cualesquiera de las moléculas de ácidos nucleicos descritas aquí. Se describen animales no humanos producidos mediante el procedimiento de transfectar una célula en el animal con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas aquí, en el que el animal es un mamífero. También se describen animales no humanos producidos mediante el procedimiento de transfectar una célula en el animal con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas aquí, en el que el mamífero es ratón, rata, conejo, vaca, oveja, cerdo, o primate.

45 También se describen animales producidos mediante el procedimiento de añadir al animal cualquiera de las células descritas aquí.

F. Ejemplos

50 Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a aquellos expertos en la técnica una descripción y explicación completa de cómo se obtienen y se evalúan los compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o métodos reivindicados aquí, y están destinados para ser puramente ejemplares de la invención y no pretenden limitar el alcance de lo que el Dr. Tomlinson considera su invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se podrían encontrar algunos errores y desviaciones. Excepto que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, la temperatura está en °C o está a la temperatura ambiente, y la presión es la atmosférica o próxima a ella.

1. Ejemplo 1: Dianización de inhibidores del complemento mediada por el receptor 2 del complemento (CR2) hacia sitios de activación del complemento

a) Métodos

(1) Estirpes celulares y ADN.

5 Todas las manipulaciones del ADN se llevaron a cabo en el vector de expresión de mamífero PBM, derivado de p118-mIgG1 (30) mediante supresión de la región codificante de Fc de IgG1 de ratón. Para la expresión proteica se usaron células de ovario de hámster chino (CHO), y se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (GIBCO Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) suplementado con 10% de FCS. Los clones de células CHO transfectados de forma estable se cultivaron en presencia de G418, y, para la expresión proteica recombinante, las
10 células se cultivaron en suspensión en CHO-S-SFM II sin FCS (GIBCO). Se cultivaron células U937 en RPMI (GIBCO), 10% de FCS.

(2) Anticuerpos, reactivos y suero.

15 El anticuerpo de conejo para DAF y CD59 humanas purificadas de membrana de células de CHO se preparó mediante técnicas estándar (31). Se describen mAb anti-DAF de ratón 1H4 (32), mAb anti-CD59 de rata YTH53.1 (33) y mAb anti-CR2 humana de ratón 171 (se une a SCR 1-2) (34). IgM anti-eritrocitos de oveja se obtuvo de Research Diagnostic Inc. (Flanders, NJ). Todos los anticuerpos secundarios se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO). sCD59 recombinante purificada fue un regalo de Dr. B. P. Morgan (University of Wales, Cardiff, UK). El suero humano sin C6 se adquirió de Quidel (San Diego, CA), y el suero humano normal (NHS) se obtuvo de la sangre de voluntarios sanos en el laboratorio.

(3) Construcción de plásmidos de expresión y expresión proteica.

20 En la Figura 1 se representan las proteínas de fusión recombinantes y los inhibidores solubles del complemento. Los constructos de ADNc se prepararon uniendo la secuencia CR2 que codifica las 4 unidades de SCR N-terminales (restos 1-250 de proteína madura, número de acceso Swissprot P20023) a las secuencias que codifican regiones extracelulares de DAF o CD59. Las secuencias de los inhibidores del complemento usadas codificaron los restos 1-249 de la secuencia de la proteína DAF madura (número de acceso Swissprot P08174) y los restos 1-77 de la
25 secuencia proteica de CD59 madura (número de acceso Swissprot P13987). Para unir las secuencias de CR2 a las secuencias de los inhibidores del complemento, se usaron secuencias ligadoras que codifican SS(GGGGS)₃ y (GGGS)₂ para proteínas de fusión que contienen CR2 en el término C y término N, respectivamente. Los constructos génicos se prepararon mediante metodología de PCR estándar (35). Todas las etapas de clonación se llevaron a cabo en el vector PBM, que también se usó para la expresión proteica (30). Para la expresión, los plásmidos se transfectaron en células CHO usando lipofectamina según las instrucciones del fabricante (GIBCO). Se seleccionaron clones transfectados de forma estable limitando la dilución como se describe (30), y la expresión proteica de los clones se cuantificó mediante ELISA.

(4) Ensayos de ELISA y de proteínas.

35 La detección de las proteínas recombinantes y la determinación de la concentración proteica relativa en los sobrenadantes de cultivo se logró usando una técnica de ELISA estándar (31). Dependiendo de qué tipo de proteína recombinante se estaba evaluando, el anticuerpo de captura fue mAb 1H4 anti-DAF o mAb YTH53.1 anti-CD59. Los anticuerpos de detección primarios fueron anticuerpo policlonal de conejo anti-DAF o anti-CD59. En algunos ELISA, también se usó mAb A-3 anti-CR2 como anticuerpo de detección primario, y, aunque menos sensible, se obtuvieron
40 datos similares. La concentración proteica de las proteínas recombinantes se determinó mediante absorbancia de UV o usando un kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce Chemical Company, Rockford I11).

(5) Purificación de proteínas.

45 Las proteínas recombinantes se purificaron del sobrenadante de cultivo mediante cromatografía de afinidad. Las columnas de afinidad se prepararon acoplado mAb 1H4 anti-DAF o mAb YTH53.1 anti-CD59 a columnas de afinidad activadas con NHS HiTrap (Pharmacia Biotech, Nueva Jersey, USA), como se describe por el fabricante. Los sobrenadantes de cultivo que contienen proteínas recombinantes se ajustaron hasta pH 8,0 y se aplicaron a columnas de afinidad a un caudal de 0,5 ml/min. La columna se lavó con 6 a 8 volúmenes de columna de PBS, y las proteínas recombinantes se eluyeron con 2 a 3 volúmenes de columna de 0,1 M de glicina, pH 2,4. Las fracciones que contienen la proteína de fusión se recogieron en tubos que contienen 1 M de tampón de Tris, pH 8,0, y se dializaron frente a PBS.
50

(6) SDS-PAGE y transferencia Western.

55 Las proteínas recombinantes purificadas se separaron en geles de acrilamida al 10% de SDS-PAGE (Bio-Rad Life Science, Hercules, CA) en condiciones no reductoras. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie. Para la transferencia Western, se siguieron procedimientos estándar (31). De forma breve, las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno, y las proteínas transferidas se detectaron por medio de

mAb 1H4 anti-DAF o mAb YTH53.1 anti-CD59. Las membranas se desarrollaron con el kit de detección de ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). También se analizó CR2-CD59 mediante SDS-PAGE tras el tratamiento con glucanasa. CR2-CD59 (2 mg) se calentó a 95°C durante 3 min en 15 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 7,5) que contiene 0,1% de SDS, 10 mM de 2-mercaptoetanol y 5 nM de EDTA. Después de enfriar, CR2-CD59 se incubó con 3 U de N-glucanasa de *Flavobacterium meningosepticum* (EC 3.5.1.52, Sigma) durante 20 h a 37°C en presencia de 1% de Nonidet P40 y 9,3 mM de PMSF.

(7) Citometría de flujo.

La unión de las proteínas de fusión recombinantes a células opsonizadas con C3 se determinó mediante citometría de flujo. Las células de CHO se incubaron en 10% de antisuero anti-CHO (30 min/4°C), se lavaron y se incubaron en 10% de NHS sin C6 (45 min/ 37°C). Las células opsonizadas con C3 se lavaron entonces y se incubaron con 1 µM de proteína recombinante (60 min/4°C). Después del lavado, las células se incubaron con 10 µg/ml de mAb 1H4 anti-DAF o mAb YTH53.1 anti-CD59, según sea apropiado (30 min/4°C), seguido del anticuerpo secundario conjugado con FITC (1:100, 30 min/4°C). Las células se lavaron entonces, se fijaron con 2% de paraformaldehído en PBS, y se analizaron usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Todas las incubaciones y lavados se llevaron a cabo en DMEM.

(8) Análisis de la unión de la proteína de fusión de CR2 al ligando de C3.

El análisis cinético de la interacción de las proteínas de fusión de CR2 con C3dg-biotina se llevó a cabo usando medidas de resonancia plasmónica de superficie (SPR) realizadas en un instrumento BIAcore 3000. C3dg-biotina humana, preparada como se describe (36), se unió a la superficie de chips sensores de estreptavidina (SA) de BIAcore inyectando C3dg-biotina a 50 µg/ml sobre la superficie de una celda de flujo del chip a 2 µl/minuto durante 20 minutos. El tampón de flujo fue 0,5X PBS + 0,05% de Tween 20. La señal de SPR de C3dg capturado generó unidades de respuesta de BIAcore que oscilan de 250-500. Las células de flujo revestidas con estreptavidina de control se hicieron pasar en ausencia de proteína. La unión se evaluó a lo largo de un intervalo de concentraciones de proteína de fusión de CR2 (15,6-500 nM) en 0,5X PBS, 0,05% de Tween 20 a 25°C a un caudal de 25 µl/minuto. Las muestras de proteína de fusión de CR2 se inyectaron en alícuotas de 50 µl usando el comando kinject. La asociación de las proteínas de fusión con el ligando se monitorizó durante 120 segundos, después de lo cual se dejó que el complejo se disociara en presencia de tampón solamente durante 120 segundos adicionales. La superficie de unión se regeneró entre análisis de concentraciones diferentes de proteínas de fusión mediante un pulso de 10 segundos de 200 mM de carbonato de sodio (pH 9,5) a 50 µl/min. La unión de los fragmentos de las proteínas de fusión de CR2 a células de flujo inmovilizadas con C3d se corrigió para la unión a células de flujo de control. Los datos de la unión se ajustaron a un modelo de unión de Langmuir 1:1 usando el software de BIAevaluation Versión 3.1 (BIAcore), y se evaluaron para el mejor ajuste mediante los valores de χ^2 y residual bajo. Los perfiles de disociación cinética obtenidos se usaron para calcular velocidades de asociación y de disociación (k_a y k_d) y constantes de afinidad (K_D) usando el programa de BIAevaluation Versión 3.1. Entre experimentos, la superficie de estreptavidina se regeneró con un pulso de 60 s de 50 mM de hidróxido sódico (pH 9,5) a 50 µl/minuto, y se volvió a aplicar C3dg-biotina como se describe anteriormente.

(9) Ensayos de lisis del complemento.

Células de CHO a un confluencia de 60%-80% se despegaron con verseno (GIBCO), se lavaron dos veces, y se resuspendieron hasta 10^6 /ml en DMEM. Las células se sensibilizaron con el complemento añadiendo 10% de antisuero de conejo anti-membrana celular de CHO a las células (30 min/4°C). El antisuero se eliminó entonces, y las células se resuspendieron en NHS diluido en DMEM. Los volúmenes de ensayo finales fueron 50 o 100 µl. Después de 45 min a 37°C, se determinó la viabilidad celular mediante exclusión con azul de tripán (tanto células vivas como muertas contadas) o liberación de ^{51}Cr (37). Ambos ensayos dieron resultados similares. Para ensayar la actividad inhibitoria del complemento de las proteínas recombinantes, las proteínas se diluyeron en DMEM y se añadieron a NHS antes de la adición a las células de CHO. Se usó una concentración final de 10% de NHS, lo que dio como resultado aproximadamente 90% de lisis de células de CHO sensibilizadas con el anticuerpo sin proteger. La inhibición de la hemólisis mediada por el complemento se determinó usando eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpos (EA) (Advanced Research Technologies, San Diego, CA). Los ensayos hemolíticos se llevaron a cabo en tampón de veronal en gelatina (GVB⁺⁺) (Advanced Research Technologies) en un volumen final de 300 µl que contiene $2,5 \times 10^7$ EA, NHS a una dilución final de 1/300 y concentraciones en incremento de proteína de fusión. Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 60 min, y las reacciones se detuvieron mediante adición de 300 µl de PBS que contiene 10 mM de EDTA. Las células se eliminaron mediante centrifugación, y la lisis celular se ensayó mediante cuantificación espectrofotométrica de hemoglobina en el sobrenadante a 413 nm.

(10) Adhesión de células U937 a eritrocitos.

Se llevaron a cabo ensayos de adhesión dependiente de CR3 a eritrocitos opsonizados con C3 esencialmente como se describe (38). De forma breve, se sensibilizaron eritrocitos de oveja recientes (SRBC) con una cantidad subaglutinante predeterminada de IgM de conejo anti-SRBC durante 30 min a 37°C en GVB (Advanced Research Technologies). Después de lavar dos veces, SRBC opsonizados con C3b se prepararon incubando SRBC sensibilizado con IgM con un volumen igual de una dilución 1:2 de suero humano deficiente en C6 en GVB (120

min/37°C). Las células se lavaron dos veces, y los peletes se resuspendieron en GVB. La mayoría de C3 unido a los eritrocitos tras este tratamiento está en forma de productos de degradación iC3b o C3d (ligandos de CR2) debido a la semivida corta de C3b en el suero. Se añadieron células U937 (4×10^5 células en 200 μ l) a 50 μ l de SRBC opsonizados C3 con (2×10^6 células), y la mezcla se centrifugó (4min/40 x g) y se dejó a temperatura ambiente durante 90 min. Las células se examinaron entonces mediante microscopía de contraste de fases, y se determinó el número de células U937 adherentes a eritrocitos. Se puntuaron al menos 100 eritrocitos por muestra, y se calculó el número medio de células U937 unidas por eritrocito. Las determinaciones por triplicado se realizaron para cada experimento llevado a cabo. En algunas realizaciones, las células U937 se cultivaron durante 3 días en presencia de miristato-acetato de forbol 50 ng/ml (PMA) antes de cosechar, un tratamiento que da como resultado el aumento de CR3 (39, 40). Como controles, se usaron células incubadas con SRBC revestidos con IgM solos, o SRBC incubados directamente con suero humano deficiente en C6.

(11) Estudios de biodistribución.

Se llevaron a cabo procedimientos estándar para determinar la distribución tisular de proteínas radiomarcadas inyectadas (41, 42). De forma breve, se inyectaron 1,7 μ g de CR2-DAF marcada con 125 I ($4,20 \times 10^6$ cpm/mg) o sDAF ($4,84 \times 10^6$ cpm/mg) en la vena de la cola de ratones NZB/NZW F1 hembras de 34 semanas (Jackson Labs, Bar Harbor, ME). Después de 24 h, se tomó una muestra de sangre y se retiraron los órganos principales, se desprendió y se lavó con PBS que contiene 10 mM de EDTA, se pesó y se contó. La especificidad de la dianización se evaluó como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido. Las proteínas se iodaron usando el método de iodógeno según las instrucciones del fabricante (Pierce Chemical Co.).

(12) Microscopía de inmunofluorescencia.

Se inyectaron CR2-DAF o sDAF (270 μ g) en la vena de la cola de ratones MRL/lpr de 24 semanas. Veinticuatro horas más tarde, los riñones se retiraron y se congelaron instantáneamente. Secciones criostáticas (5 μ m) preparadas a partir de riñones congelados se fijaron en acetona y se procesaron para la microscopía de inmunofluorescencia indirecta. Se usó una mezcla equimolar de mAbs anti- DAF humana 1A10 y 1H6 de ratón como anticuerpos de detección primarios (concentración final, 10 μ g/ml) con un anticuerpo secundario conjugado a FITC específico de Fc anti-IgG de ratón (F4143, Sigma-Aldrich). Se siguieron procedimientos estándar (49, incorporados aquí como referencia por su enseñanza de técnicas de tinción de anticuerpos), excepto que para reducir la tinción de fondo, muy probablemente provocada por complejos inmunitarios depositados en el riñón de ratón, el anticuerpo secundario marcado con FITC se diluyó 1:800 (10 veces la dilución recomendada). Se adquirieron imágenes digitales y se optimizaron con Adobe Photoshop usando ajustes idénticos.

b) Resultados.

(1) Diseño, expresión y purificación de los constructos.

Las proteínas de fusión recombinantes contenían las cuatro unidades de SCR N-terminales de CR2 humana enlazadas al término N o C de formas solubles de CD59 o DAF humana (constructos representados en la Figura 1). Las proteínas recombinantes se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo de clones de células de CHO trasfectados de forma estable, con rendimientos entre 100-200 μ g/l. El análisis de las proteínas recombinantes purificadas mediante SDS-PAGE y transferencia Western reveló proteínas en el intervalo de pesos moleculares esperados (Figura 2), y, excepto para CR2-CD59, todas las proteínas migraron como una única banda. Las dos bandas observadas para CR2-CD59 fueron debidas a diferencias en la glucosilación, puesto que CR2-CD59 migró como una única banda tras el tratamiento con glucanasa.

(2) Dianización de proteínas de fusión a células opsonizadas del complemento.

El ligando de C3 para CR2 se depositó sobre células de CHO mediante incubación de células de CHO con anticuerpo activante del complemento y suero sin C6 (para prevenir la formación de MAC y la lisis celular). Todas las proteínas de fusión que contienen CR2, pero no sCD59 o sDAF se unieron a células de CHO revestidas con C3 (Figura 3).

(3) Análisis cinético de la interacción entre proteínas de fusión y el ligando C3dg.

Se determinó mediante medidas de resonancia plasmónica de superficie una comparación de la afinidad de las diferentes proteínas de fusión recombinantes para el ligando C3dg de CR2. Los experimentos se llevaron a cabo haciendo pasar concentraciones variables de las proteínas de fusión sobre chips de estreptavidina de Biacore que contienen C3dg-biotina capturada (aproximadamente 2000 unidades de respuesta). El análisis cinético de los datos mostró el mejor ajuste a un modelo de interacción de unión 1:1 (Langmuir) usando parámetros de ajuste global (Figura 4). Ambas proteínas de fusión con CR2 en el término N (CR2-DAF y CR2-CD59) mostraron perfiles de unión similares, con una velocidad rápida de asociación y una velocidad rápida de disociación. Por el contrario, la unión de las proteínas de fusión con CR2 en el término C (DAF-CR2 y CD59-CR2) mostró velocidades lentas de asociación y de disociación (Figura 4, Tabla 1). Sin embargo, las proteínas de fusión de CR2 del término N se unieron con la mayor afinidad (Tabla 1). Las proteínas de fusión de CD59 se unieron con una mayor afinidad que las proteínas de fusión de DAF. DAF soluble y sCD59 no se unieron a C3dg inmovilizado.

(4) Actividad inhibidora del complemento de las proteínas de fusión.

La actividad inhibidora del complemento de los inhibidores del complemento dianizados y no dianizados se analizó midiendo su efecto sobre la lisis mediada por el complemento tanto de células de CHO como eritrocitos. En estos experimentos, las células sensibilizadas a anticuerpos y las proteínas recombinantes se incubaron en suero humano a una concentración que dio como resultado una lisis de 90-100% de las células sin proteger. Para ambos tipos celulares, los inhibidores del complemento dianizados fueron significativamente más eficaces que sus proteínas no dianizadas respectivas a la hora de inhibir la lisis mediada por el complemento. Las proteínas de DAF dianizadas fueron más eficaces como inhibidores que CD59 dianizada (Figuras 5 y 6). Las proteínas de fusión que contienen CR2 enlazado al término N de DAF y CD59 fueron inhibidores más eficaces que las proteínas de fusión de CR2 C-terminales. El inhibidor más potente de la lisis del complemento fue CR2-DAF, que requiere una concentración de 18 nM para una inhibición del 50% de la lisis de células de CHO. Por el contraste, sDAF no dianizadas requirió una concentración de 375 nM para la inhibición del 50% de la lisis de células de CHO, una diferencia de 20 veces (Figura 5a). sCD59 fue un inhibidor particularmente malo del complemento, y sólo proporcionó 25% de protección de la lisis de células de CHO a 500 nM, la concentración más elevada ensayada. Sin embargo, CR2-CD59 proporcionó una inhibición del 50% de la lisis de células de CHO a 102 nM, y fue más eficaz que sDAF sin dianizar (Figura 6a). La Tabla 4 compara las actividades inhibidoras de los diferentes inhibidores del complemento recombinantes. La mayor actividad inhibidora del complemento de las proteínas de fusión de CR2 del término N se correlacionó con la mayor afinidad de estas proteínas mostrada para el ligando de C3dg (Tabla 3).

Hubo algunas diferencias entre la eficacia relativa de los inhibidores del complemento a la hora de proteger células de CHO y eritrocitos de la lisis mediada por el complemento. Esto fue particularmente cierto para los inhibidores de DAF; sDAF fue significativamente más eficaz protegieron eritrocitos que las células de CHO del complemento, aunque DAF dianizada fue todavía más eficaz. También hubo poca diferencia en la actividad inhibidora de CR2-DAF y DAF-CR2 cuando los eritrocitos fueron las células diana para la lisis del complemento.

(5) Efecto de proteínas de fusión de CR2 sobre la adhesión celular.

El receptor 3 del complemento es un receptor leucocítico implicado en la adhesión endotelial y diapedesis y la activación de mecanismos citolíticos celulares (fagocitosis y desgranulación). Puesto que CR2 y CR3 comparten el mismo ligando del complemento iC3b, se determinó si las proteínas de fusión de CR2 interfirieron con la unión de las células mediada por CR3. Para estos experimentos, se usaron U937, una extirpe celular promonocítica bien caracterizada (CR2⁻, CR3⁺) que se un a eritrocitos revestidos con iC3b en un mecanismo dependiente de CR3 (40). Todas las proteínas de fusión de CR2, pero no sDAF o sCD59, inhibieron significativamente la unión de células U937 a eritrocito de oveja opsonizados con C3 ($P < 0,01$). Cada proteína de fusión de CR2 inhibió la unión de U937 en un grado similar a una concentración de 500 nM (figura 7). Se obtuvieron datos similares en un experimento usando células U937 que se estimularon con PMA, un tratamiento que dio como resultado el aumento de CR3 (39, 40). Para la opsonización del complemento de eritrocitos, se usó IgM para activar el complemento, puesto que IgG depositada sobre los eritrocitos se acoplaría a receptores Fc γ expresados en células U937. Las células U937 también expresan CR4 (p150, 95, CD11c/CD18), un tercer receptor que comparte el ligando de Ci3b. Sin embargo, la unión de células U937 a eritrocitos opsonizados con C3 es independiente de CR4, probablemente debido a la asociación de CR4 con el citoesqueleto y su inmovilidad en la membrana (40).

(6) Dianización de CR2-DAF a los riñones de ratones nefríticos.

Para determinar si una proteína de fusión de CR2 seleccionará como diana un sitio de activación del complemento y de enfermedad in vivo, se llevó a cabo un estudio de biodistribución de CR2-DAF y sDAF en ratones hembras NZB/W F1. Los ratones NZB/W F1 desarrollan una enfermedad autoinmunitaria espontánea que es muy similar a lupus eritematoso sistémico (SLE) humano, con la producción de autoanticuerpos y el desarrollo de glomerulonefritis grave mediada por complejo inmunitario que está asociada con la deposición del complemento desde 26 a 28 semanas (4, 52). La biodistribución de [¹²⁵I]CR2-DAF y [¹²⁵I]sDAF en ratones NZB/W F1 de 34 semanas se determinó a las 24 horas y a las 48 horas después de la inyección. Veinticuatro horas después de la inyección de [¹²⁵I]CR2-DAF en la vena de la cola, se localizó en el riñón una proporción de radioactividad significativamente mayor que en los otros órganos que se examinaron (Figura 25a). A las 48 horas después de la inyección de [¹²⁵I]CR2-DAF, hubo un nivel similar de radioactividad en el riñón como a las 24 horas, pero aumentó la radioactividad en el hígado y en el bazo, y disminuyó la radioactividad en la sangre (Figura 25b). El hígado y el bazo son sitios de aclaramiento del complejo inmunitario, y probablemente dan cuenta de la dianización incrementada de [¹²⁵I]CR2-DAF a estos órganos en el punto de tiempo más tardío. [¹²⁵I]CR2-DAF no mostró unión preferente en el riñón o en ningún otro órgano (Figura 25, a y b). En ratones prenefríticos NZB/W F1 de 8 semanas, no hubo signos de dianización de [¹²⁵I]CR2-DAF hacia el riñón (Figura 25c). De interés adicional, [¹²⁵I]CR2-DAF se aclaró mucho más rápidamente de la circulación que [¹²⁵I]CR2-DAF, sugiriendo que el resto CR2 funciona para prolongar la semivida circulatoria de la proteína de fusión. Sin embargo, el nivel de [¹²⁵I]CR2-DAF en la sangre de ratones más jóvenes a las 24 horas fue alrededor de la mitad que el registrado en los ratones más viejos, y la semivida circulatoria prolongada de [¹²⁵I]CR2-DAF puede ser una consecuencia, al menos en parte, de su unión a complejos inmunitarios circulantes.

La dianización de CR2-DAF hacia el complemento depositado en el riñón también se examinó en otro modelo murino de SLE, mediante examen directo de secciones del riñón. Al igual que los ratones NZB/W F1 hembras, los ratones MRL/lpr desarrollan glomerulonefritis proliferativa grave con la deposición de complemento en asociación con depósitos inmunitarios glomerulares hacia las 24 semanas de edad (53, incorporado aquí por su enseñanza de este modelo de ratón). Se inyectaron CR2-DAF y sDAF en la vena de la cola de ratones MRL/lpr de 24 semanas, y se analizaron secciones de riñón 24 horas más tarde en busca de inmunorreactividad a DAF humana mediante microscopía de fluorescencia. Las secciones de riñón procedentes de un ratón inyectado con CR2-DAF presentaron un nivel elevado de tinción de DAF, con localización preferente en los glomérulos en un patrón idéntico al observado para complejos inmunitarios. No hubo evidencias de tinción de DAF en los glomérulos de un ratón inyectado con sDAF (Figura 26).

c) Conclusiones

Este estudio describe la generación y caracterización de proteínas que contienen DAF y CD59 humanas solubles que son dirigidas hacia un sitio de activación del complemento. Las proteínas dianizadas fueron significativamente más potentes inhibiendo el complemento que sus contrapartes no dianizadas. La dianización de CD59 y DAF se logró enlazando los inhibidores a un fragmento de CR2 humana que se une a productos de activación del complemento C3. Los ligandos de C3 para CR2 tienen una vida relativamente prolongada y se unen covalentemente, a menudo en grandes cantidades, en sitios de activación del complemento. De este modo, la dianización de la inhibición del complemento mediada por CR2 es de beneficio terapéutico para numerosas enfermedades o estados mórbidos asociados al complemento. Consistente con esta hipótesis, se mostró que CR2-DAF dianiza a los riñones de ratones NZB/W F1 nefríticos. Estos ratones producen autoanticuerpos con formación y deposición consiguiente de complejos inmunitarios en el riñón, dando como resultado la activación y deposición de complemento (2, 43). CR2 humana se une a ligandos de C3 humanos y de ratón con afinidades similares (44), y los estudios de biodistribución establecen que una proteína de fusión de CR2 retiene la función dianizadora in vivo. Este estudio establece la idoneidad de este enfoque para la inhibición de complemento humano. El enfoque de dianización también puede ser eficaz para otros inhibidores de la activación del complemento, tales como CR1 soluble, que está en ensayos clínicos y es un inhibidor del complemento más potente que DAF in vitro (9).

Las afinidades relativas por C3dg de las diferentes proteínas de fusión de CR2 recuerda a las afinidades de SCR 1-2 de CR2 y SCR 1-15 de CR2 por C3dg. Los valores de KD para las interacciones de SCR1-2 de CR2 y de SCR 1-15 de CR2 con C3dg fueron similares, pero SCR 1-2 de CR2 se asoció y se disoció mucho más rápidamente, indicando una contribución de los dominios de SCR adicionales a la afinidad global (36). El análisis de la estructura en disolución de otra proteína que contiene SCR, el factor H, indicó que los dominios de SCR están replegados sobre sí mismos, y las interacciones entre los dominios de SCR pueden modular las características de unión al ligando de C3 (45). Se predice que la variabilidad conformacional entre dominios de SCR resulta de diferentes longitudes de ligador (nativo), proporcionando ligadores más prolongados una mayor flexibilidad conformacional. En este contexto, los dominios de SCR de CR2 y DAF están enlazados con un ligador ser-gly relativamente largo, y esto puede permitir que las parejas de fusión se replieguen unas sobre otras dando como resultado interacciones SCR-SCR que pueden modular la afinidad de unión de CR2.

Se llevaron a cabo ensayos de lisis mediada por el complemento usando como dianas células de CHO sensibilizadas a anticuerpos o eritrocitos de oveja. Hubo diferencias notables en las actividades relativas de algunos de los inhibidores del complemento a la hora de proteger las diferentes células de la lisis mediada por el complemento. sDAF, DAF-CR2, y CD59-CR2 fueron significativamente más eficaces protegiendo eritrocitos de oveja que las células de CHO de la lisis mediada por el complemento. A diferencia de los eritrocitos, la lisis mediada por el complemento de células nucleadas no es debida completamente a desregulación osmótica coloidal, y se requiere la deposición de múltiples MACs en la membrana plasmática (46-48). La mayoría de los estudios previos que investigan la actividad inhibidora de inhibidores del complemento solubles (no dianizados) se han llevado a cabo usando eritrocitos como células diana para la lisis mediada por el complemento. Sin embargo, las células de CHO representan probablemente una diana fisiológicamente más relevante para estudios in vitro.

Diferentes mecanismos de daño mediado por el complemento están implicados en diversas afecciones, y diferentes enfermedades se pueden beneficiar de estrategias de inhibición que actúan en diferentes puntos en la ruta. Por ejemplo, si es aplicable para la enfermedad, un beneficio particular de bloqueo del complemento en una etapa tardía en la ruta sería que las funciones de defensa del hospedante y los mecanismos de homeostasia inmunitarios del complemento permaneciesen intactos. De este modo un inhibidor a base de CD59 proporcionaría ventajas con respecto a inhibidores de la activación del complemento en enfermedades en las que la ruta citolítica terminal está implicada principalmente en la patogénesis. Es improbable que CD59 soluble tenga beneficio terapéutico debido a su actividad muy mala in vitro, pero se mostró aquí que la dianización de CD59 mediada por CR2 aumentó significativamente su actividad inhibidora del complemento. De hecho, CR2-CD59 fue más eficaz inhibiendo la lisis mediada por el complemento que sDAF, y sDAF ha mostrado eficacia terapéutica in vivo (8). Los análogos de CR2-CD59 de roedores también pueden ser herramientas útiles para estudiar los papeles relativos de productos de activación del complemento tempranos frente a la formación de MAC en la patogénesis de la enfermedad. Las contribuciones relativas de los diferentes productos de activación del complemento a la lesión tisular en muchos estados mórbidos están poco comprendidas y son controvertidas.

Las proteínas de fusión de CR2 inhibieron la unión de las células U937 a eritrocitos opsonizados con C3. Tanto CR2 como CR3 se unen a iC3b, y este dato indica que las proteínas de fusión de CR2 actúan como antagonistas de CR3, puesto que la unión de U937 a eritrocitos opsonizados con C3 depende de CR3 (40). Como molécula de adhesión, CR3 media la adhesión endotelial y diapédesis en sitios de inflamación vía su interacción de afinidad elevada con la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1). Como receptor del complemento, CR3 promueve y potencia la fagocitosis y desgranulación vía su interacción con iC3b. Tanto ICAM-1 como iC3b se unen a epítomos solapantes en CR3 (véase la revisión de Ross). De este modo, CR3 puede ser un determinante importante a la hora de promover daño tisular mediado por células en sitios de inflamación, y los anticuerpos que bloquean CR3 han mostrado eficacia en varias afecciones inflamatorias (véase el repaso de Ross). El efecto antagonista de CR2 sobre la unión de CR3 indica por lo tanto un segundo mecanismo antiinflamatorio de acción de las proteínas de fusión del inhibidor del complemento de CR2, que actúa sinérgicamente con inhibición del complemento.

La dianización de inhibidores del complemento a sitios de activación y enfermedad del complemento puede potenciar considerablemente su eficacia. De hecho, para estados mórbidos que se beneficiarían de la terapia a base de CD59, la dianización de CD59 al sitio de activación del complemento será un requisito. Una ventaja de la dianización mediada por CR2 con respecto a otros enfoques de dianización, tales como dianización mediada por anticuerpos, es que el resto de CR2 selecciona como diana cualquier sitio accesible de activación del complemento, y tiene una amplia aplicación terapéutica. Las proteínas de fusión de CR2 también pueden actuar como antagonistas de CR3, y esto puede representar un segundo beneficio terapéutico importante. Las proteínas de fusión del inhibidor del complemento de CR2 humano también tienen mucha menor probabilidad de ser inmunógenas que los inhibidores recombinantes que contienen regiones variables de anticuerpos. La capacidad predicha de inhibidores dianizados de la activación del complemento para proporcionar una concentración local eficaz con niveles bajos de inhibición sistémica también disminuye la probabilidad de comprometer los mecanismos de defensa del hospedante, particularmente con inhibición del complemento sistémica a largo plazo (esto es una consideración menos importante para inhibidores a base de CD59). Los inhibidores dianizados a CR2 también seleccionan como dianas a agentes infecciosos que activan el complemento.

2. Ejemplo 2: Inhibición y activación del complemento dianizado

a) Inhibidores del complemento (inflamación/bioincompatibilidad)

Los inhibidores de complemento son una promesa considerable para la terapia de muchas enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, y estados mórbidos asociados con bioincompatibilidad. Actualmente no hay ningún inhibidor farmacéutico seguro y eficaz del complemento. La investigación se ha centrado enormemente en desarrollar inhibidores solubles basados en proteínas reguladoras del complemento unidas a la membrana celular. Se han producido formas recombinantes de CR1, MCP, DAF y Crry solubles mediante eliminación de regiones que se unen a la membrana, y se ha demostrado que todas las proteínas son eficaces reduciendo la inflamación y el daño tisular mediado por el complemento en diversos modelos de enfermedad. CR1 soluble y un anticuerpo que bloquea la función de la proteína del complemento C5 están en ensayos clínicos. Sin embargo, hay serias cuestiones que se refieren al uso clínico de inhibidores del complemento solubles administrados sistémicamente. El complemento desempeña un papel crucial tanto en la inmunidad innata como adaptativa, y la generación de C3b es crítica para la opsonización y aclaramiento mediado por leucocitos de muchos microorganismos patógenos. Además, se ha demostrado que el producto de la activación del complemento en fase fluida C5a es importante a la hora de controlar la infección, y puede ser importante en el aclaramiento de sustancias patógenas desde la circulación. Por lo tanto, es probable que la inhibición sistémica del complemento tenga consecuencias serias para el hospedante con respecto a su capacidad para controlar la infección. El complemento también es crucial para el catabolismo eficaz de complejos inmunitarios, y esto es una consideración particularmente importante en el uso de inhibidores del complemento para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y de complejos inmunitarios.

La dianización de inhibidores del complemento hacia sitios de activación y enfermedad del complemento también permite una concentración sérica eficaz mucho menor, y reduce significativamente el nivel de inhibición sistémica del complemento. Una mayor eficacia es un beneficio importante de los inhibidores del complemento dianizados, y la dianización también puede resolver el problema de una semivida corta de los inhibidores del complemento recombinantes solubles en la circulación.

Además de las consideraciones anteriores con respecto a la dianización de inhibidores del complemento, el bloqueo selectivo de diferentes partes de la ruta del complemento puede permitir la generación de productos beneficiosos de la activación del complemento, pero inhibe la generación de productos de la activación del complemento implicados en la patogénesis de la enfermedad. Por ejemplo, los inhibidores de la activación del complemento (tales como CR1, DAF, Crry) inhiben la generación de C3b, C5a y C5b-9. Los anticuerpos contra C5 inhiben la generación de C5a y C5b-9. Por otro lado, los inhibidores a base de CD59 no afectan a la generación de C3b y C5a, sino que bloquean solamente la formación de C5b-9 (véase la Figura 8). La ruta del complemento terminal y la generación de C5b-9 ha demostrado ser importante a la hora de promover inflamación, y está particularmente implicada en la progresión de algunas enfermedades del riñón (tales como glomerulonefritis por complejo inmunitario). De este modo, para ciertas enfermedades, un inhibidor a base de CD59 puede inhibir la patogénesis de la enfermedad sin interferir con la generación de productos tempranos de la activación del complemento que son importantes para la defensa del hospedante y el aclaramiento del complejo inmunitario. Sin embargo, CD59 soluble no es un inhibidor eficaz del

complemento (a diferencia de los inhibidores de la activación DAF, CR1, MCP o Crry), y es improbable que tenga alguna aplicación clínica. Sin embargo, CD59 dirigida contra las células puede representar un compuesto terapéutico viable. Los datos que usan dianización de CD59 mediada por anticuerpos [Zhang et al., 1999, J.Clin.Invest., 103, 55-61], y los datos presentados aquí con la dianización de CD59 mediada por CR2, muestran que CD59 dianizada hacia una membrana celular es significativamente más eficaz que CD59 sin dianizar soluble.

c) RESULTADOS-1

(1) Proteína de fusión del inhibidor del complemento dianizada

Los ejemplos de proteínas de fusión humanas que se han expresado, purificado y caracterizado para dianización y evaluado para determinar la función inhibidora del complemento in vitro como se describe previamente incluyen los siguientes: CR2-DAF, CR2-CD59, DAF-CR2, y CD59-CR2. Las secuencias nucleotídicas y las secuencias de aminoácidos predichas de las proteínas de fusión humanas maduras se muestran en las Figuras 8-11.

(2) EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN

Los constructos plasmídicos de ADNc que codifican las proteínas de fusión se transfectaron en células de CHO y clones que se expresan de forma estable aislados. Se seleccionaron clones que expresan los niveles más elevados de fusión. Los clones seleccionados se hicieron crecer en biorreactores, y las proteínas de fusión se aislaron del sobrenadante de cultivo mediante cromatografía de afinidad. Se prepararon columnas de afinidad usando anticuerpos anti-DAF y anti-CD59 conjugados con sefarosa. Las proteínas recombinantes se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia Western (Figura 2).

(3) UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN A C3

LIGANDOS.

(a) Citometría de flujo

Se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo como se describe previamente. Todas las proteínas de fusión que contienen CR2 se unieron a células de CHO revestidas con C3, según se analiza mediante citometría de flujo (Figura 12). sDAF y sCD59 no se unieron a células de CHO revestidas con C3.

(b) ELISA

Se llevaron a cabo experimentos de ELISA como se describe previamente. En los experimentos de ELISA, se añadieron constructos que contienen CR2 a pocillos revestidos con C3dg purificado. La unión se detectó por medio de anticuerpos anti-inhibidor del complemento y anticuerpos secundarios conjugados a enzimas. Todos los constructos que contienen CR2, pero no sCD59 y sDAF, se unieron a C3d.

(c) Resonancia de plasmones de superficie

C3dg biotinilado (ligando de CR2) se unió a chips de BIAcore revestidos con estreptavidina y se midió la cinética de unión de las proteínas de fusión que contienen CR2 (Figuras 13-16). sDAF y sCD59 no se unieron a C3dg capturado. Las proteínas de fusión con CR2 en el término N se unieron con la mayor afinidad. Las proteínas de fusión que contienen CD59 se unieron con una afinidad mayor que las proteínas de fusión correspondientes que contienen DAF.

(4) FUNCIÓN INHIBIDORA DEL COMPLEMENTO DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN

La actividad funcional de las proteínas de fusión e inhibidores del complemento no dianizados solubles se analizó midiendo el efecto de las proteínas sobre la lisis celular mediada por el complemento. Se usaron en ensayos usando células de ovario de hámster chino (CHO) (Figuras 17 y 18) y eritrocitos de oveja (E) (Figuras 19 y 20).

Los inhibidores del complemento dianizados proporcionaron significativamente más protección frente a la lisis mediada por el complemento que los inhibidores del complemento no dianizados solubles. Las proteínas de fusión que contienen CR2 en el término N fueron las más eficaces tanto para las proteínas de fusión que contienen DAF como CD59. Las proteínas de fusión de CR2 N-terminal también se unieron a D3d con una afinidad mayor que las proteínas de fusión de CR2 C-terminal en experimentos de BIAcore (véase anteriormente). CR2-DAF fue significativamente más eficaz que CR2-CD59 a la hora de proporcionar protección frente a la lisis mediada por el complemento en estos ensayos. Cabe señalar, sin embargo, que sCD59 no dianizada posee una actividad inhibidora del complemento muy débil incluso a concentración elevada (a diferencia de sDAF), y la dianización de CD59 a la superficie celular es un requisito para la función de CD59.

La eficacia relativa de inhibidores del complemento dianizados frente a los no dianizados para células de CHO y para E es diferente. Sin embargo, los eritrocitos se lisan "de una sola vez" (es decir, formación de un único MAC provoca la lisis de E), mientras que las células nucleadas (tales como CHO) poseen mecanismos de resistencia adicionales (tales como protección y desprendimiento de MACs) y requieren la deposición de múltiples MACs para la

lisis. Estas diferencias dan cuenta probablemente de las diferencias en los datos de inhibición de la lisis, y probablemente las células de CHO representan la diana fisiológicamente más relevante para estos experimentos in vitro.

3. Ejemplo 3

5 a) Anticuerpo dianizado para inhibidores del complemento en un modelo de rata de lesión tubulointersticial aguda:

Se usó un panel de anticuerpos monoclonales de ratón anti-riñón de rata bien caracterizados (49, 50, incorporado aquí como referencia por su enseñanza con respecto a estos anticuerpos y sus secuencias). El ADN de la región variable de un total de 5 anticuerpos se aisló mediante técnicas de PCR estándar (35, incorporadas aquí como referencia por sus enseñanzas con respecto a PCR). Todos se clonaron con éxito y algunos se expresaron como anticuerpos monocatenarios. Todos los anticuerpos monocatenarios reconocieron in vitro una estirpe celular epitelial o endotelial de riñón de rata. Uno de los mAbs, K9/9, se une a una glucoproteína identificada sobre la superficie celular epitelial, y tiene especificidad por la pared capilar glomerular y túbulos proximales in vivo (49). Este anticuerpo se escogió como un vehículo de dianización para la investigación de la inhibición del complemento dianizada mediada por sCrry y por CD59 en un modelo de rata de lesión tubulointersticial aguda. Aunque se demostró que mAb K9/9 induce daño glomerular en un estudio previo (49), el anticuerpo fue sólo patógeno cuando se administró junto con adyuvante de Freund. De hecho, la naturaleza patógena de mAb K9/9 (con adyuvante) no se reprodujo.

Hay una relación entre proteinuria y daño renal progresivo, y hay datos que apoyan la hipótesis de que la propia proteinuria da como resultado fibrosis intersticial e inflamación. No se conoce el mecanismo mediante el cual la proteinuria conduce a lesión nefrotóxica, pero hay pruebas de que el complemento desempeña un papel clave, y que el MAC es el mediador principal de la lesión tubulointersticial debido a proteinuria (se ha revisado recientemente el papel del complemento y de la proteinuria en lesión tubulointersticial (51, 52)). La caracterización previa de mAb K9/9 (véase anteriormente (49)) sugirió que el mAb selecciona como diana apropiadamente para una investigación en el uso terapéutico de inhibidores del complemento dianizados en un modelo de rata de lesión tubulointersticial inducida por proteinuria. La disponibilidad de un inhibidor que puede bloquear específicamente la formación de MAC permitiría una evaluación del papel de MAC en lesión tubulointersticial en condiciones clínicamente relevantes.

Se prepararon constructos plasmídicos que codifican el anticuerpo K9/9 monocatenario enlazado a Crry de rata o CD59 de rata (representados en la fig. 27). También se prepararon constructos que expresan Crry soluble de rata (sCrry) y K9/9 monocatenario (vehículo de dianización solamente). Todas las proteínas recombinantes se expresaron en el medio de cultivo a alrededor de 15 mg/litro mediante fermentación de *Pichia* en un fermentador de New Brunswick de 15 litros.

Las proteínas recombinantes se caracterizaron para la dianización y la actividad inhibidora del complemento in vitro como se describe anteriormente usando una estirpe de células epiteliales de rata como células diana. K9/9 monocatenario, K9/9-Crry y K9/9-CD59 se unieron específicamente a células epiteliales de rata in vitro. sCrry y K9/9-Crry inhibieron la deposición y lisis del complemento, y K9/9-CD59 inhibió la lisis mediada por el complemento. Ambos inhibidores del complemento dianizados, sCrry y el Ab monocatenario K9/9 se caracterizaron en el modelo de nefrosis de aminonucleósido puromicina (PAN) de rata (53, incorporado aquí como referencia por su enseñanza de sCrry y K9/9) (sCD59 no se evaluó, puesto que CD59 sin dianizar tiene sólo una actividad inhibidora del complemento muy pobre (54)). En primer lugar, para confirmar la dianización de las proteínas de fusión de K9/9 al riñón, se determinó la especificidad de unión in vivo mediante biodistribución de proteínas yodadas como se describe anteriormente (54, 41). Las proteínas de fusión de K9/9 y K9/9 monocatenario, pero no sCrry, seleccionaron específicamente como dianas a riñones de rata, y fue detectado a 48 h después de la administración (fig. 28). La biodistribución a 24 h después de la administración fue similar, y no hubo ningún radiomarcador restante en la sangre a 24 h.

En estudios terapéuticos, grupos de 4 ratas recibieron PAN (150 mg/kg) en el día 0, y PBS o inhibidor del complemento (40 mg/kg) en los días 4, 7 y 10. Se recogió orina (jaulas metabólicas) y sangre, y los animales se sacrificaron en el día 11. El tratamiento con PAN alteró significativamente la función renal según se mide mediante el aclaramiento de creatinina (fig. 29, segunda barra desde la izquierda). Hubo una ligera mejora, pero no significativa, en la función renal en ratas que recibieron terapia con sCrry. Sin embargo, el aclaramiento de creatinina mejoró significativamente en ratas tratadas con PAN que recibieron terapia con Crry o CD59 dianizada ($p < 0,01$). No hubo diferencia significativa en el aclaramiento de creatinina entre ratas de control (no proteinúricas) y ratas tratadas con PAN que recibieron los inhibidores dianizados (fig. 29). Como se esperaba, la proteinuria inducida por PAN fue elevada en todas las ratas tanto si se trataron con inhibidores del complemento o no (tabla 1). Las secciones de riñón preparadas a partir de ratas tratadas con PAN y que no recibieron terapia mostraron dilatación de la luz tubular y degeneración de células epiteliales y tubulares, según se evaluó mediante la pérdida del borde de brocha (véase fig. 30b, también en el apéndice). Se observó una mejora mínima con terapia con sCrry (fig. 30d). Por el contrario, la dilatación y degeneración tubular se suprimió significativamente en ratas tratadas con PAN que recibieron Crry y CD59 dianizadas (fig. 30c muestra K9/9-Crry, pero la histología fue indistinguible con K9/9-CD59). Estos datos demuestran eficacia terapéutica de la inhibición del complemento en este modelo, demuestran un beneficio significativo de la inhibición del complemento dianizada frente a la no dianizada, y demuestran directamente un

papel importante para el daño mediado por MAC en lesión tubulointersticial inducida por proteinuria. sCD59 no es un inhibidor eficaz, y este estudio demuestra que CD59 apropiadamente dianizada permite la inhibición específica del MAC en vivo.

5 En un experimento separado, se determinó la semivida circulatoria de proteínas recombinantes yodadas como se describe (54, 41, incorporado aquí como referencia para las técnicas ensayadas allí). Las semividas (t1/2) de las proteínas fueron según lo siguiente: sCrry: 19 min, K9/9-Crry: 23 min, K9/9-CD59, 29 min, K9/9 monocatenario: 21 min. Para determinar el efecto de las proteínas recombinantes sobre la inhibición del complemento sistémica, se inyectaron a ratas con proteínas a 40 mg/Kg, y se recogió sangre en los tiempos que corresponden a 1, 3, 5 y 7 x t1/2. La actividad inhibidora del complemento en el suero se determinó midiendo la actividad hemolítica (eritrocitos de oveja sensibilizados). Como se esperaba, K9/9-CD59 tuvo una actividad inhibidora mínima en el suero (sistema de ensayo no dianizado (fig. 31). En alrededor de 3 h (7 x t1/2) después de la inyección de sCrry y K9/9-Crry, hubo una actividad inhibidora del complemento mínima que queda en el suero. El t1/2 corto de los inhibidores dianizados y no dianizados, junto con datos de biodistribución y el hecho de que sCrry no es protectora, demuestra que los inhibidores del complemento unidos al riñón son eficaces inhibiendo localmente el complemento y durante un período prolongado.

Estos datos establecen el uso de inhibidores del complemento dianizados in vivo, y demuestran los beneficios importantes de la inhibición del complemento sistémica dianizada frente a no dianizada en un modelo de enfermedad. Aunque en estos estudios se usó un vehículo de dianización diferente (un fragmento de anticuerpo), se aplican los mismos principios para otros agentes de dianización, tales como CR2.

20 4. Ejemplo 4

Se describen aquí ejemplos de constructos de la presente invención obtenidos según la enseñanza aquí. La terminología usada tiene el siguiente significado: SCR = repeticiones de consenso cortas; LP = péptido líder. Los constructos tienen todos la fórmula básica de CR2-ligador-modulador del complemento o modulador del complemento-ligador-CR2. Las notaciones en paréntesis indican detalles con una sección particular de la composición. Por ejemplo, "(completa)" significa que toda la proteína madura se usa en el constructo, mientras que "(SCR2-4)" indica que SCR1 no es parte del constructo. Se entiende que un ligador puede ser un ligador químico, un péptido ligador natural, o secuencias ligadoras de aminoácidos (por ejemplo, (Gly4Ser)3). Se entiende que esta lista no es limitante, y sólo proporciona ejemplos de algunos de los constructos descritos en la presente solicitud.

30 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-DAF
 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-CD59 humana
 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-MCP
 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-CR1
 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-Crry
 35 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-CD59 de ratón
 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-IgG1 Fc humana
 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-IgM Fc humana
 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-IgG3 Fc murina
 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-IgM Fc murina
 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-CVF
 40 CR2 (completa) - (Gly3Ser)4-DAF
 CR2 (completa) - (Gly3Ser)4-CD59 humana
 CR2 (completa) - (Gly3Ser)4-MCP
 CR2 (completa) - (Gly3Ser)4-CR1
 CR2 (completa) - (Gly3Ser)4-Crry
 45 CR2 (completa) - (Gly3Ser)4-CD59 de ratón
 CR2 (completa) - (Gly3Ser)4-IgG1 Fc humana
 CR2 (completa) - (Gly3Ser)4-IgM Fc humana
 CR2 (completa) - (Gly3Ser)4-IgG3 Fc murina
 CR2 (completa) - (Gly3Ser)4-IgM Fc murina
 50 CR2 (completa) - (Gly3Ser)4-CVF
 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-DAF (SCRs 2-4)
 CR2 (completa) - (Gly3Ser)4-DAF (SCRs 2-4)
 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-CR1 (LP-SCR1-4-SCR8-11-SCR15-18)
 CR2 (completa) - (Gly4Ser)3-Crry (5 SCR N-terminales)
 55 CR2 (completa) - VSVFPLE-DAF
 CR2 (completa) - VSVFPLE-CD59 humana
 CR2 (completa) - VSVFPLE-MCP
 CR2 (completa) - VSVFPLE-CR1
 CR2 (completa) - VSVFPLE-Crry
 60 CR2 (completa) - VSVFPLE-CD59 de ratón
 CR2 (completa) - VSVFPLE-IgG1 Fc humana
 CR2 (completa) - VSVFPLE-IgM Fc humana

- CR2 (completa) - VSVFPLE -IgG3 Fc murina
 CR2 (completa) - VSVFPLE -IgM Fc murina
 CR2 (completa) - VSVFPLE -CVF
 CR2 (completa) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster --DAF
 5 CR2 (completa) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -CD59 humana
 CR2 (completa) -*m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster --MCP
 CR2 (completa) -*m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -CR1
 CR2 (completa) - *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster --Crry
 CR2 (completa) - *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster-CD59 de ratón
 10 CR2 (completa) - *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -IgG1 Fc humana
 CR2 (completa) - *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -IgM Fc humana
 CR2 (completa) - *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -IgG3 Fc murina
 CR2 (completa) - *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -IgM Fc murina
 CR2 (completa) - *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -CVF
 15 CR2 (completa) - bismaleimidohexano --DAF
 CR2 (completa) - bismaleimidohexano -CD59 humana
 CR2 (completa) - bismaleimidohexano --MCP
 CR2 (completa) - bismaleimidohexano -CR1
 CR2 (completa) - bismaleimidohexano --Crry
 20 CR2 (completa) - bismaleimidohexano -CD59 de ratón
 CR2 (completa) - bismaleimidohexano -IgG1 Fc humana
 CR2 (completa) - bismaleimidohexano -IgM Fc humana
 CR2 (completa) - bismaleimidohexano -IgG3 Fc murina
 CR2 (completa) - bismaleimidohexano -IgM Fc murina
 25 CR2 (completa) - bismaleimidohexano -CVF
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃--DAF
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃-CD59 humana
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃--MCP
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃-CR1
 30 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃--Crry
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃-CD59 de ratón
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃-IgG1 Fc humana
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃-IgM Fc humana
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃-IgG3 Fc murina
 35 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃-IgM Fc murina
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃--CVF
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₃Ser)₄--DAF
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₃Ser)₄-CD59 humana
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₃Ser)₄--MCP
 40 CR2 (SCR1-2) - (Gly₃Ser)₄-CR1
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₃Ser)₄--Crry
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₃Ser)₄-CD59 de ratón
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₃Ser)₄-IgG1 Fc humana
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₃Ser)₄-IgM Fc humana
 45 CR2 (SCR1-2) - (Gly₃Ser)₄-IgG3 Fc murina
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₃Ser)₄-IgM Fc murina
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₃Ser)₄-CVF
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃-DAF (SCRs 2-4)
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₃Ser)₄-DAF (SCRs 2-4)
 50 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃-CR1 (LP--SCR1-4-SCR8-11-SCR15-18)
 CR2 (SCR1-2) - (Gly₄Ser)₃-Crry (5 SCR N-terminales)
 CR2 (SCR1-2) - VSVFPLE--DAF
 CR2 (SCR1-2) - VSVFPLE -CD59 humana
 CR2 (SCR1-2) - VSVFPLE --MCP
 55 CR2 (SCR1-2) - VSVFPLE -CR1
 CR2 (SCR1-2) - VSVFPLE --Crry
 CR2 (SCR1-2) - VSVFPLE -CD59 de ratón
 CR2 (SCR1-2) - VSVFPLE -IgG1 Fc humana
 CR2 (SCR1-2) - VSVFPLE -IgM Fc humana
 60 CR2 (SCR1-2) - VSVFPLE -IgG3 Fc murina
 CR2 (SCR1-2) - VSVFPLE -IgM Fc murina
 CR2 (SCR1-2) - VSVFPLE -CVF
 CR2 (SCR1-2) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster --DAF
 CR2 (SCR1-2) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -CD59 humana
 65 CR2 (SCR1-2) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster --MCP
 CR2 (SCR1-2) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -CR1

CR2 (SCR1-2) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster --Crry
 CR2 (SCR1-2) - *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -CD59 de ratón
 CR2 (SCR1-2) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -IgG1 Fc humana
 CR2 (SCR1-2) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -IgM Fc humana
 5 CR2 (SCR1-2) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -IgG3 Fc murina
 CR2 (SCR1-2) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -IgM Fc murina
 CR2 (SCR1-2) - *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -CVF
 CR2 (SCR1-2) - bismaleimidohexano -DAF
 CR2 (SCR1-2) - bismaleimidohexano -CD59 humana
 10 CR2 (SCR1-2) - bismaleimidohexano -MCP
 CR2 (SCR1-2) - bismaleimidohexano -CR1
 CR2 (SCR1-2) - bismaleimidohexano --Crry
 CR2 (SCR1-2) - bismaleimidohexano -CD59 de ratón
 CR2 (SCR1-2) - bismaleimidohexano -IgG1 Fc humana
 15 CR2 (SCR1-2) - bismaleimidohexano -IgM Fc humana
 CR2 (SCR1-2) - bismaleimidohexano -IgG3 Fc murina
 CR2 (SCR1-2) - bismaleimidohexano -IgM Fc murina
 CR2 (SCR1-2) - bismaleimidohexano -CVF
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃--DAF
 20 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃-CD59 humana
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃--MCP
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃-CR1
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃--Crry
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃-CD59 de ratón
 25 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃-IgG1 Fc humana
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃-IgM Fc humano
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃-IgG3 Fc murino
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃-IgM Fc murino
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃--CVF
 30 CR2 (SCR1-3) - (Gly₃Ser)₄--DAF
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₃Ser)₄-CD59 humana
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₃Ser)₄--MCP
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₃Ser)₄-CR1
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₃Ser)₄--Crry
 35 CR2 (SCR1-3) - (Gly₃Ser)₄-CD59 de ratón
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₃Ser)₄-IgG1 Fc humana
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₃Ser)₄-IgM Fc humana
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₃Ser)₄-IgG3 Fc murina
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₃Ser)₄-IgM Fc murina
 40 CR2 (SCR1-3) - (Gly₃Ser)₄-CVF
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃-DAF (SCRs 2-4)
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₃Ser)₄-DAF (SCRs 2-4)
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃-CR1 (LP--SCR1-4-SCR8-11-SCR15-18)
 CR2 (SCR1-3) - (Gly₄Ser)₃-Crry (5 SCR N-terminales)
 45 CR2 (SCR1-3) - VSVFPLE --DAF
 CR2 (SCR1-3) - VSVFPLE -CD59 humana
 CR2 (SCR1-3) - VSVFPLE --MCP
 CR2 (SCR1-3) - VSVFPLE -CR1
 CR2 (SCR1-3) - VSVFPLE --Crry
 50 CR2 (SCR1-3) - VSVFPLE -CD59 de ratón
 CR2 (SCR1-3) - VSVFPLE -IgG1 Fc humana
 CR2 (SCR1-3) - VSVFPLE -IgM Fc humana
 CR2 (SCR1-3) - VSVFPLE -IgG3 Fc murina
 CR2 (SCR1-3) - VSVFPLE -IgM Fc murina
 55 CR2 (SCR1-3) - VSVFPLE --CVF
 CR2 (SCR1-3) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster --DAF
 CR2 (SCR1-3) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster-CD59 humana
 CR2 (SCR1-3) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster --MCP
 CR2 (SCR1-3) — *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster—CR1
 60 CR2 (SCR1-3) — *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster --Crry
 CR2 (SCR1-3) — *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster—CD59 de ratón
 CR2 (SCR1-3) — *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster—IgG1 Fc humana
 CR2 (SCR1-3) — *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster-IgM Fc humana
 CR2 (SCR1-3) — *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster —IgG3 Fc murina
 65 CR2 (SCR1-3) — *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster—IgM Fc murina
 CR2 (SCR1-3) — *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster—CVF

CR2 (SCR1-3) - bismaleimidohehexano --DAF
 CR2 (SCR1-3) -bismaleimidohehexano-CD59 humana
 CR2 (SCR1-3) -bismaleimidohehexano --MCP
 CR2 (SCR1-3) - bismaleimidohehexano -CR1
 5 CR2 (SCR1-3) - bismaleimidohehexano --Crry
 CR2 (SCR1-3) - bismaleimidohehexano -CD59 de ratón
 CR2 (SCR1-3) - bismaleimidohehexano —IgG1 Fc humana
 CR2 (SCR1-3) - bismaleimidohehexano —IgM Fc humana
 CR2 (SCR1-3) - bismaleimidohehexano —IgG3 Fc murina
 10 CR2 (SCR1-3) - bismaleimidohehexano —IgM Fc murina
 CR2 (SCR1-3) - bismaleimidohehexano —CVF
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃--DAF
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃-CD59 humana
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃--MCP
 15 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃-CR1
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃--Crry
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃-CD59 de ratón
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃-IgG1 Fc humana
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃-IgM Fc humana
 20 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃-IgG3 Fc murina
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃-IgM Fc murina
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃--CVF
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₃Ser)₄--DAF
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₃Ser)₄-CD59 humana
 25 CR2 (SCR1-4) - (Gly₃Ser)₄--MCP
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₃Ser)₄-CR1
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₃Ser)₄--Crry
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₃Ser)₄ CD59 de ratón
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₃Ser)₄-IgG1 Fc humana
 30 CR2 (SCR1-4) - (Gly₃Ser)₄-IgM Fc humana
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₃Ser)₄-IgG3 Fc murina
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₃Ser)₄-IgM Fc murina
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₃Ser)₄-CVF
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃-DAF (SCRs 2-4)
 35 CR2 (SCR1-4) - (Gly₃Ser)₄-DAF (SCRs 2-4)
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃-CR1 (LP--SCR1-4-SCR8-11-SCR15-18)
 CR2 (SCR1-4) - (Gly₄Ser)₃-Crry (5 SCR N-terminales)
 CR2 (SCR1-4) - VSVFPLE--DAF
 CR2 (SCR1-4) - VSVFPLE -CD59 humana
 40 CR2 (SCR1-4) - VSVFPLE --MCP
 CR2 (SCR1-4) - VSVFPLE -CR1
 CR2 (SCR1-4) - VSVFPLE --Crry
 CR2 (SCR1-4) - VSVFPLE -CD59 de ratón
 CR2 (SCR1-4) - VSVFPLE -IgG1 Fc humana
 45 CR2 (SCR1-4) - VSVFPLE —IgM Fc humana
 CR2 (SCR1-4) - VSVFPLE —IgG3 Fc murina
 CR2 (SCR1-4) - VSVFPLE -IgM Fc murina
 CR2 (SCR1-4) - VSVFPLE-CVF
 CR2 (SCR1-4) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster --DAF
 50 CR2 (SCR1-4) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster—CD59 humana
 CR2 (SCR1-4) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster --MCP
 CR2 (SCR1-4) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -CR1
 CR2 (SCR1-4) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster --Crry
 CR2 (SCR1-4) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -CD59 de ratón
 55 CR2 (SCR1-4) - *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster-IgG1 Fc humana
 CR2 (SCR1-4) - *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -IgM Fc humana
 CR2 (SCR1-4) - *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -IgG3 Fc murina
 CR2 (SCR1-4) --- *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster -IgM Fc murina
 CR2 (SCR1-4) - *m*-Maleimidobenzoil-*N*-hidoxisuccinimida éster-CVF
 60 CR2 (SCR1-4) - bismaleimidohehexano --DAF
 CR2 (SCR1-4) - bismaleimidohehexano -CD59 humana
 CR2 (SCR1-4) - bismaleimidohehexano --MCP
 CR2 (SCR1-4) - bismaleimidohehexano -CR1
 CR2 (SCR1-4) - bismaleimidohehexano --Crry
 65 CR2 (SCR1-4) - bismaleimidohehexano -CD59 de ratón
 CR2 (SCR1-4) - bismaleimidohehexano -IgG1 Fc humana

CR2 (SCR1-4) - bismaleimidohehexano -IgM Fc humana
 CR2 (SCR1-4) - bismaleimidohehexano -IgG3 Fc murina
 CR2 (SCR1-4) - bismaleimidohehexano -IgM Fc murina
 CR2 (SCR1-4) - bismaleimidohehexano -CVF

5

G. Referencias

1. Wang, Y., Rollins, S.A., Madri, J.A., y Matis, L.A. 1995. Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8955-8959.
2. Wang, Y., Hu, Q., Madri, J.A., Rollins, S.A., Chodera, A., y Matis, L.A. 1996. Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/W F1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5. *Proc.Watl.Acad.Sci. USA* 93:8563-8568.
3. Kaplan, M. 2002. Eculizumab (Alexion). *Curr Opin Investig Drugs* 3:1017-1023.
4. Whiss, P.A. 2002. Pexelizumab Alexion. *Curr Opin Investig Drugs* 3:870-877.
5. Weisman, H.F., Bartow, T., Leppo, M.K., Marsh, H.C., Carson, G.R., Consino, M.F., Boyle, M.P., Roux, K.H., Weisfeldt, M.L., y Fearon, D.T. 1990. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 249:146-151.
6. Rioux, P. 2001. TP-10 (AVANT Immunotherapeutics). *Curr Opin Investig Drugs* 2:364-371.
7. Higgins, P.J., Ko, J.-L., Lobell, R., Sardonini, C., Alessi, M.K., y Yeh, C.G. 1997. A soluble chimeric complement activating inhibitory protein that possesses both decay-accelerating and factor I cofactor activities. *J.Immunol.* 158: 2872-2881.
8. Moran, P., Beasley, H., Gorrel, A., Martin, E., Gribling, P., Fuchs, H., Gillet, W., Burton, L.E., y Caras, I.W. 1992. Human recombinant soluble decay accelerating factor inhibits complement activation in vitro and in vivo. *J.Immunol.* 149:1736-1743.
9. Christiansen, D., Milland, J., Thorley, B.R., McKenzie, I.F., y Loveland, B.E. 1996. A functional analysis of recombinant soluble CD46 in vivo and a comparison with recombinant soluble forms of CD55 and CD35 in vitro. *ejci* 26:578-585.
10. Salerno, C.T., Kulick, D.M., Yeh, C.G., Guzman-Paz, M., Higgins, P.J., Benson, B.A., Park, S.J., Shumway, S.J., Bolman, R.M., 3º, y Dalmasso, A.P. 2002. A soluble chimeric inhibitor of C3 and C5 convertases, complement activation blocker-2, prolongs graft survival in pig-to-rhesus monkey heart transplantation. *Xenotransplantation* 9:125-134.
11. Kroshus, T.J., Salerno, C.T., Yeh, C.G., Higgins, P.J., Bolman, R.M., 3º y Dalmasso, A.P. 2000. A recombinant soluble chimeric complement inhibitor composed of human CD46 and CD55 reduces acute cardiac tissue injury in models of pig-to-human heart transplantation. *Transplantation* 69:2282-2289.
12. Rushmere, W.K., Van Den Berg, C.W., y Morgan, B.P. 2000. Production and functional characterization of a soluble recombinant form of CD59 de ratón. *Immunology* 99:326-332.
13. Quigg, R.J., He, C., Hack, B.K., Alexander, J.J., y Morgan, B.P. 2000. Production and functional analysis of rat CD59 and chimeric CD59-Crry as active soluble proteins in *Pichia pastoris*. *Immunology* 99:46-53.
14. Sugita, Y., Ito, K., Shiozuka, K., Gushima, H., Tomita, M., y Masuho, Y. 1994. Recombinant soluble CD59 inhibits reactive haemolysis with complement. *Immunol.* 82:34-41.
15. Meri, S., Lehto, T., Sutton, C.W., Tyynela, J., y Batumann, M. 1996. Structural composition and functional characterization of soluble CD59: heterogeneity of the oligosaccharide and glycoposphoinositol (GPI) anchor revealed by laser-desorption mass spectrometric analysis. *Biochem J* 316 (Pt 3):923-935.
16. Mulligan, M.S., Warner, R.L., Ritterhaus, C.W., Thomas, L.J., Ryan, U.S., Foreman, K.E., Crouch, L.D., Till, G.O., y Ward, P.A. 1999. Endothelial targeting and enhanced antiinflammatory effects of complement inhibitors possessing silayl lewisX moieties. *J.Immunol.* 162:4952-4959.
17. Ritterhaus, C.W., Thomas, L.J., Miller, D.P., Picard, M.D., Georhegan-Barek, K.M., Scesney, S.M., Henry, L.D., Sen, A.C., Bertino, A.M., Hannig, G., *et al.* 1999. Recombinant glycoproteins that inhibit complement activation and also bind the selectin adhesion molecules. *J.Biol.Chem.* 274:11237-11244.
18. Zhang Hf, H., Lu, S., Morrison, S.L., y Tomlinson, S. 2001. Targeting of functional antibody-decay accelerating factor (DAF) fusion proteins to a cell surface. *J Biol Chem* 14:14.

19. Zhang, H.-F., Yu, J., Bajwa, E., Morrison, S.L., y Tomlinson, S. 1999. Targeting of functional antibody-CD59 fusion proteins to a cell surface. *J. Clin. Invest.* 103:55-66.
20. Linton, S.M., Williams, A.S., Dodd, I., Smith, R., Williams, B.D., y Morgan, B.P. 2000. Therapeutic efficacy of a novel membrane-targeted complement regulator in antigen-induced arthritis in the rat. *Arthritis Rheum* 43: 2590-2597.
21. Smith, G.P., y Smith, R.A. 2001. Membrane-targeted complement inhibitors. *Mol Immunol* 38:249-255.
22. Carroll, M.C. 1998. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu.Rev.Immunol.* 16:545-568.
23. Carroll, M.C. 2000. The role of complement in B cell activation and tolerance. *Adv Immunol* 74:61-88.
24. Holers, V.M. 1989. Complement receptors. *Year Immunol* 4:231-240.
25. Dierich, M.P., Schulz, T.F., Eigentler, A., Huemer, H., y Schwable, W. 1988. Structural and functional relationships among receptors and regulators of the complement system. *Mol Immunol* 25:1043-1051.
26. Lowell, C.A., Klickstein, L.B., Carter, R.H., Mitchell, J.A., Fearon, D.T., y Ahearn, J.M. 1989. Mapping of the Epstein-Barr virus and C3dg binding sites to a common domain on complement receptor type 2. *J Exp Med* 170: 1931-1946.
27. Szakonyi, G., Guthridge, J.M., Li, D., Young, K., Holers, V.M., y Chen, X.S. 2001. Structure of complement receptor 2 in complex with its C3d ligand. *Science* 292:1725-1728.
28. Law, S.K., Fearon, D.T., y Levine, R.P. 1979. Action of the C3b-inactivator on the cell-bound C3b. *J Immunol* 122:759-765.
29. Seya, T., y Wagasawa, S. 1985. Limited proteolysis of complement protein C3b by regulatory enzyme C3b inactivator: isolation and characterization of a biologically active fragment, C3d,g. *J Biochem (Tokyo)* 97:373-382.
30. Quigg, R.A., Kozono, Y., Berthiaume, D., Lim, A., Salant, J., Weinfeld, A., Griffin, P., Kremmer, E., y Holers, V.M. 1998. Blockade of antibody-induced glomerulonephritis with Crry-Ig, a soluble murine complement inhibitor. *J. Immunol.* 160:4553-4560.
31. Harlow, E., y Lane, D. 1988. *Antibodies. A laboratory manual.* Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory.
32. Kim, S. 1993. Liposomes as carriers of cancer chemotherapy. *Current sataus and future prospects.* *Drugs* 46: 618-638.
33. Davies, A., Simmons, D.L., Hale, G., Harrison, R.A., Tighe, H., Lachmann, P.J., y Waldmann, H. 1989. CD59, an Ly-6 protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex of homologous cells. *Journal of Experimental Medicine* 170:637-654.
34. Guthridge, J.M., Young, K., Gipson, M.G., Sarrias, M.R., Szakonyi, G., Chen, X.S., Malaspina, A., Donoghue, E., James, J.A., Lambris, J.D., *et al.* 2001. Epitope mapping using the X-ray crystallographic structure of complement receptor type 2 (CR2)/CD21: identification of a highly inhibitory monoclonal antibody that directly recognizes the CR2-C3d interface. *J Immunol* 167:5758-5766.
35. 1995. *PCR Primer. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
36. Guthridge, J.M., Rakstang, J.K., Young, K.A., Hinshelwood, J., Aslam, M., Robertson, A., Gipson, M.G., Sarrias, M.R., Moore, W.T., Meagher, M., *et al.* 2001. Structural studies in solution of the recombinant W-terminal pair of short consensus/complement repeat domains of complement receptor type 2 (CR2/CD21) and interactions with its ligand C3dg. *Biochemistry* 40:5931-5941.
37. Yu, J., Caragine, T., Chen, S., Morgan, B.P., Frey, A.F., y Tomlinson, S. 1999. Protection of human breast cancer cells from complement-mediated lysis by expression of heterologous CD59. *Clin. Exp. Immunol.* 115:13-18.
38. Duits, A.J., Jainandunsing, S.M., van de Winkel, J.G., y Capel, P.J. 1991. Selective enhancement of Leu-CAM expression by interleukin 6 during differentiation of human promonocytic U937 cells. *Scand J Immunol* 33: 151-159.
39. Rothlein, R., y Springer, T.A. 1986. The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol éster. *J Exp Med* 163:1132-1149.

40. Ross, G.D., Reed, W., Dalzell, J.G., Becker, S.E., y Hogg, N. 1992. Macrophage cytoskeleton association with CR3 and CR4 regulates receptor mobility and phagocytosis of iC3b-opsonized erythrocytes. *J Leukoc Biol* 51: 109-117.

5 41. Sharkey, R.M., Motta-Hennessy, C., Pawlyk, D., Siegel, J.A., y Goldenberg, D.M. 1990. Biodistribution and dose estimates for yttrium and iodine labeled monoclonal antibody IgG and fragments in nude mice bearing human colonic tumor xenografts. *Cancer Res.* 50:2330-2336.

42. Sharkey, R.M., Natale, A., Goldenberg, D.M., y Mattes, M.J. 1991. Rapid blood clearance of immunoglobulin G2a and immunoglobulin G2b in nude mice. *Cancer Res* 51:3102-3107.

10 43. Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., Izui, S., Wilson, C.B., McConahey, P.J., Murphy, E.D., Roths, J.B., y Dixon, F.J. 1978. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med* 148:1198-1215.

44. Hebell, T., Ahearn, J.M., y Fearon, D.T. 1991. Suppression of the immune response by a soluble complement receptor of B lymphocytes. *Science* 254:102-105.

15 45. Aslam, M., y Perkins, S.J. 2001. Folded-back solution structure of monomeric factor H of human complement by synchrotron X-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained molecular modelling. *J Mol Biol* 309:1117-1138.

46. Koski, C.L., Ramm, L.E., Hammer, C.H., Mayer, M.M., y Shin, M.L. 1983. Cytolysis of nucleated cells by complement: cell death displays multi-hit characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3816-3820.

20 47. Ramm, L.E., Whitlow, M.B., y Mayer, M.M. 1982. Transmembrane channel formation by complement: functional analysis of the number of C5b6, C7, C8, and C9 molecules required for a single channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:4751-4755.

48. Takeda, J., Kozono, H., Takata, Y., Hong, K., Kinoshita, T., Sayama, K., Tanaka, E., y Inoue, K. 1986. Number of hits necessary for complement-mediated hemolysis. *Microbiol Immunol* 30:461-468.

25 49. Mendrick, D.L., y H.G. Rennke. 1988. Induction of proteinuria in the rat by a monoclonal antibody against SGP-115/107. *Kidney Int* 33:818-830.

50. Mendrick, D.L., H.G. Rennke, R.S. Cotran, T.A. Springer, y A.K. Abbas. 1983. Monoclonal antibodies against rat glomerular antigens: production and specificity. *Laboratory Investigation* 49:107-117.

30 51. Hsu, S.I., y W.G. Couser. 2003. Chronic progression of tubulointerstitial damage in proteinuric renal disease is mediated by complement activation: a therapeutic role for complement inhibitors? *J Am Soc Nephrol* 14:S186-191.

52. Sheerin, N.S., y S.H. Sacks. 2002. Leaked protein and interstitial damage in the kidney: is complement the missing link? *Clin Exp Immunol* 130:1-3.

35 53. Hori, Y., K. Yamada, N. Hanafusa, T. Okuda, N. Okada, T. Miyata, W.G. Couser, K. Kurokawa, T. Fujita, y M. Nangaku. 1999. Crry, a complement regulatory protein, modulates renal interstitial disease induced by proteinuria. *Kidney Int* 56:2096-2106.

54. Song, H., C. He, C. Knaak, J.M. Guthridge, V.M. Holers, y S. Tomlinson. 2003. Complement receptor 2-mediated targeting of complement inhibitors to sites of complement activation. *J Clin Invest* 111:1875-1885.

H. Secuencias

1. DAF

40 Secuencia nucleotídica corresponde a SEC ID nº 1
Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 2

2. CD59

45 Secuencia nucleotídica corresponde a SEC ID nº 3
Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 4

3. CR2-DAF

Secuencia nucleotídica corresponde a SEC ID nº 5
Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 6

4. CR2-CD59 humano

50 Secuencia nucleotídica corresponde a SEC ID nº 7

- Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 8
5. DAF-CR2
5 Secuencia nucleotídica corresponde a SEC ID nº 9
 Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 10
6. CD59 humano-CR2
10 Secuencia nucleotídica corresponde a SEC ID nº 11
 Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 12
7. CR1
 Secuencia nucleotídica corresponde a SEC ID nº 13
 Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 14
- 15 8. MCP
 Secuencia nucleotídica corresponde a SEC ID nº 15
 Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 16
- 20 9. Cry de ratón
 Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 17
10. IgG1 Fc humana
 Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 18
- 25 11. IgM Fc humana
 Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 19
12. CR2-IgG1 Fc humana
30 Secuencia nucleotídica corresponde a SEC ID nº 20
 Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 21
13. IgG3 Fc de ratón
 Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 22
- 35 14. Factor de veneno de cobra
 Secuencia nucleotídica corresponde a SEC ID nº 23
 Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 24
- 40 15. CR2 humana
 Secuencia nucleotídica corresponde a SEC ID nº 25
 Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 26
- 45 16. CR2 de ratón
 Secuencia nucleotídica corresponde a SEC ID nº 27
 Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 28
17. CR2 humana
 Secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID nº 29

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MUSC Foundation For Research Development

<120> Moduladores de complemento dianas sobre el receptor 2 de complemento

<130> 19113.0095P1

5 <150> 60/426,676

<151> 15-11-2002

<160> 29

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1

10 <211> 1041

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

15 <400> 1

```

gactgtggcc ttccccaga tgtacctaat gccagccag ctttggagg ccgtacaagt 60
tttcccagg atactgtaat aacgtacaaa tgtgaagaaa gctttgtgaa aattcctggc 120
gagaaggact cagtgatctg ccttaagggc agtcaatggc cagatattga agagttctgc 180
aatcgtagct gcgaggtgcc aacaaggcta aattctgcat ccctcaaaca gccttatatc 240
actcagaatt attttccagt cggtaactgt gtggaatatg agtgccgtcc aggttacaga 300
agagaacctt ctctatcacc aaaactaact tgccttcaga atttaaatg gtccacagca 360
gtcgaatfff gtaaaaagaa atcatgccct aatccgggag aaatacgaaa tggtcagatt 420
gatgtaccag gtggcatatt atttgggtgca accatctcct tctcatgtaa cacaggggtac 480
aaattatttg gctcgacttc tagtttttgt cttatttcag gcagctctgt ccagtgagg 540
gaccgttgc cagagtgcag agaaatttat tgtccagcac caccacaaat tgacaatgga 600
ataattcaag gggaacgtga ccattatgga tatagacagt ctgtaacgta tgcattgta 660
aaaggattca ccatgattgg agagcactct atttattgta ctgtgaataa tgatgaagga 720
gagtgaggag gcccaccacc tgaatgcaga ggaaaatctc taacttccaa ggtcccacca 780
acagttcaga aacctaccac agtaaatggt ccaactacag aagtctcacc aacttctcag 840
aaaaccacca caaaaaccac cacaccaaat gctcaagcaa cacggagtac acctgtttcc 900
aggacaacca agcattttca tgaacaacc ccaaataaag gaagtggaac cacttcaggt 960
actaccctgc ttctatctgg gcacacgtgt ttcacgttga .caggtttgct tgggacgcta 1020
gtaacctagg gcttgctgac t                                     1041

```

<210>2

<211>380

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 2

ES 2 392 511 T3

Met Thr Val Ala Arg Pro Ser Val Pro Ala Ala Leu Pro Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Leu Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Leu Leu Cys Leu Pro Ala Val
 20 25 30

Trp Asp Cys Gly Leu Pro Pro Asp Val Pro Asn Ala Gln Pro Ala Leu
 35 40 45
 Glu Gly Arg Thr Ser Phe Pro Glu Asp Thr Val Ile Thr Tyr Lys Cys
 50 55 60
 Glu Glu Ser Phe Val Lys Ile Pro Gly Glu Lys Asp Ser Val Ile Cys
 65 70 75 80
 Leu Lys Gly Ser Gln Trp Ser Asp Ile Glu Glu Phe Cys Asn Arg Ser
 85 90 95
 Cys Glu Val Pro Thr Arg Leu Asn Ser Ala Ser Leu Lys Gln Pro Tyr
 100 105 110
 Ile Thr Gln Asn Tyr Phe Pro Val Gly Thr Val Val Glu Tyr Glu Cys
 115 120 125
 Arg Pro Gly Tyr Arg Arg Glu Pro Ser Leu Ser Pro Lys Leu Thr Cys
 130 135 140
 Leu Gln Asn Leu Lys Trp Ser Thr Ala Val Glu Phe Cys Lys Lys Lys
 145 150 155 160
 Ser Cys Pro Asn Pro Gly Glu Ile Arg Asn Gly Gln Ile Asp Val Pro
 165 170 175
 Gly Gly Ile Leu Phe Gly Ala Thr Ile Ser Phe Ser Cys Asn Thr Gly
 180 185 190
 Tyr Lys Leu Phe Gly Ser Thr Ser Ser Phe Cys Leu Ile Ser Gly Ser
 195 200 205
 Ser Val Gln Trp Ser Asp Pro Leu Pro Glu Cys Arg Glu Ile Tyr Cys
 210 215 220
 Pro Ala Pro Pro Gln Ile Asp Asn Gly Ile Ile Gln Gly Glu Arg Asp
 225 230 235 240
 His Tyr Gly Tyr Arg Gln Ser Val Thr Tyr Ala Cys Asn Lys Gly Phe
 245 250 255
 Thr Met Ile Gly Glu His Ser Ile Tyr Cys Thr Val Asn Asn Asp Glu
 260 265 270
 Gly Glu Trp Ser Gly Pro Pro Pro Glu Cys Arg Gly Lys Ser Leu Thr
 275 280 285
 Ser Lys Val Pro Pro Thr Val Gln Lys Pro Thr Thr Val Asn Val Pro
 290 295 300
 Thr Thr Glu Val Ser Pro Thr Ser Gln Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr
 305 310 315 320
 Thr Pro Asn Ala Gln Ala Thr Arg Ser Thr Pro Val Ser Arg Thr Thr
 325 330 335
 Lys His Phe His Glu Thr Thr Pro Asn Lys Gly Ser Gly Thr Thr Ser
 340 345 350
 Gly Thr Thr Arg Leu Leu Ser Gly His Thr Cys Phe Thr Leu Thr Gly
 355 360 365
 Leu Leu Gly Thr Leu Val Thr Met Gly Leu Leu Thr
 370 375 380

<210>3

<211>306

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

ES 2 392 511 T3

<400> 3

```

cagtgtaca actgtcctaa cccaactgct gactgcaaaa cagccgtcaa ttgttcacat 60
gattttgatg cgtgtctcat taccaaagct gggttacaag tgtataacaa gtgttggaag 120
tttgagcatt gcaatttcaa cgacgtcaca acccgcttga gggaaaatga gctaacgtac 180
tactgctgca agaaggacct gtgtaacttt aacgaacagc ttgaaaatgg tgggacatcc 240
ttatcagaga aaacagttct tctgctgggtg actccatttc tggcagcagc ctggagcctt 300
catccc 306

```

<210>4

5 <211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

10 <400> 4

```

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

```

<210>5

<211>1485

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 5

ES 2 392 511 T3

```

atttcttctg gctctctccc gcctatccta aatggccgga ttagttatta ttctaccccc 60
attgctgttg gtaccgtgat aaggtacagt tgttcaggta ccttccgcct cattggagaa 120
aaaagtctat tatgcataac taaagacaaa gtggatggaa cctgggataa acctgctcct 180
aaatgtgaat atttcaataa atattcttct tgcctgagc ccatagtacc aggaggatac 240
aaaattagag gctctacacc ctacagacat ggtgattctg tgacatttgc ctgtaaaacc 300
aacttctcca tgaacggaaa caagtctggt tgggtgtcaag caaataatat gtgggggccc 360
acacgactac caacctgtgt aagtgttttc cctctcgagt gtccagcact tcctatgatc 420
cacaatggac atcacacaag tgagaatggt ggctccattg ctccaggatt gtctgtgact 480
tacagctgtg aatctggtta cttgcttgtt ggagaaaaga tcattaactg tttgtcttcg 540
ggaaaatgga gtgctgtccc cccacatgt gaagaggcac gctgtaaatc tctaggacga 600
tttcccaatg ggaaggtaaa ggagcctcca attctccggg ttggtgtaac tgcaaacttt 660
ttctgtgatg aagggtatcg actgcaaggc ccaccttcta gtcgggtgtg aattgctgga 720
cagggagtgt cttggaccaa aatgccagta tgtggagggt ggtcgggtgg cggcggatcc 780
gactgtggcc ttccccaga tgtacctaat gccagccag ctttggagg cgtacaagt 840
tttcccagg atactgtaat aacgtacaaa tgtgaagaaa gctttgtgaa aattcctggc 900
gagaaggact cagtgatctg ccttaagggc agtcaatggt cagatattga agagtctgc 960
aatcgtagct gcgagggtgc aacaaggcta aattctgcat ccctcaaaca gccttatatc 1020
actcagaatt attttccagt cggactgtt gtggaatatg agtgccgtcc aggttacaga 1080
agagaacctt ctctatcacc aaaactaact tgccttcaga atttaaaatg gtccacagca 1140
gtcgaathtt gtaaaaagaa atcatgccct aatccgggag aaatacgaaa tggtcagatt 1200
gatgtaccag gtggcatatt atttgggtgca accatctcct tctcatgtaa cacagggtag 1260

```

```

aaattatttg gctcgacttc tagtttttgt cttatttcag gcagctctgt ccagtgaggat 1320
gacccggtgc cagagtgcag agaaatttat tgtccagcac caccacaaat tgacaatgga 1380
ataattcaag gggaacgtga ccattatgga tatagacagt ctgtaacgta tgcattgta 1440
aaaggattca ccatgattgg agagcactct atttattgta ctgtg 1485

```

<210>6

<211>495

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 6

ES 2 392 511 T3

Ile Ser Cys Gly Ser Pro Pro Pro Ile Leu Asn Gly Arg Ile Ser Tyr
1 5 10 15
Tyr Ser Thr Pro Ile Ala Val Gly Thr Val Ile Arg Tyr Ser Cys Ser
20 25 30
Gly Thr Phe Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Leu Leu Cys Ile Thr Lys
35 40 45
Asp Lys Val Asp Gly Thr Trp Asp Lys Pro Ala Pro Lys Cys Glu Tyr
50 55 60
Phe Asn Lys Tyr Ser Ser Cys Pro Glu Pro Ile Val Pro Gly Gly Tyr
65 70 75 80
Lys Ile Arg Gly Ser Thr Pro Tyr Arg His Gly Asp Ser Val Thr Phe
85 90 95
Ala Cys Lys Thr Asn Phe Ser Met Asn Gly Asn Lys Ser Val Trp Cys
100 105 110
Gln Ala Asn Asn Met Trp Gly Pro Thr Arg Leu Pro Thr Cys Val Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Glu Cys Pro Ala Leu Pro Met Ile His Asn Gly His
130 135 140
His Thr Ser Glu Asn Val Gly Ser Ile Ala Pro Gly Leu Ser Val Thr
145 150 155 160
Tyr Ser Cys Glu Ser Gly Tyr Leu Leu Val Gly Glu Lys Ile Ile Asn
165 170 175
Cys Leu Ser Ser Gly Lys Trp Ser Ala Val Pro Pro Thr Cys Glu Glu
180 185 190
Ala Arg Cys Lys Ser Leu Gly Arg Phe Pro Asn Gly Lys Val Lys Glu
195 200 205
Pro Pro Ile Leu Arg Val Gly Val Thr Ala Asn Phe Phe Cys Asp Glu
210 215 220
Gly Tyr Arg Leu Gln Gly Pro Pro Ser Ser Arg Cys Val Ile Ala Gly
225 230 235 240
Gln Gly Val Ala Trp Thr Lys Met Pro Val Cys Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255
Gly Gly Gly Ser Asp Cys Gly Leu Pro Pro Asp Val Pro Asn Ala Gln
260 265 270
Pro Ala Leu Glu Gly Arg Thr Ser Phe Pro Glu Asp Thr Val Ile Thr
275 280 285
Tyr Lys Cys Glu Glu Ser Phe Val Lys Ile Pro Gly Glu Lys Asp Ser
290 295 300
Val Ile Cys Leu Lys Gly Ser Gln Trp Ser Asp Ile Glu Glu Phe Cys
305 310 315 320
Asn Arg Ser Cys Glu Val Pro Thr Arg Leu Asn Ser Ala Ser Leu Lys
325 330 335
Gln Pro Tyr Ile Thr Gln Asn Tyr Phe Pro Val Gly Thr Val Val Glu
340 345 350
Tyr Glu Cys Arg Pro Gly Tyr Arg Glu Pro Ser Leu Ser Pro Lys
355 360 365

ES 2 392 511 T3

Leu	Thr	Cys	Leu	Gln	Asn	Leu	Lys	Trp	Ser	Thr	Ala	Val	Glu	Phe	Cys
	370	.					375				380				
Lys	Lys	Lys	Ser	Cys	Pro	Asn	Pro	Gly	Glu	Ile	Arg	Asn	Gly	Gln	Ile
385					390					395					400
Asp	Val	Pro	Gly	Gly	Ile	Leu	Phe	Gly	Ala	Thr	Ile	Ser	Phe	Ser	Cys
			405						410					415	
Asn	Thr	Gly	Tyr	Lys	Leu	Phe	Gly	Ser	Thr	Ser	Ser	Phe	Cys	Leu	Ile
			420					425					430		
Ser	Gly	Ser	Ser	Val	Gln	Trp	Ser	Asp	Pro	Leu	Pro	Glu	Cys	Arg	Glu
		435					440					445			
Ile	Tyr	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Gln	Ile	Asp	Asn	Gly	Ile	Ile	Gln	Gly
	450					455					460				
Glu	Arg	Asp	His	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Gln	Ser	Val	Thr	Tyr	Ala	Cys	Asn
465					470					475					480
Lys	Gly	Phe	Thr	Met	Ile	Gly	Glu	His	Ser	Ile	Tyr	Cys	Thr	Val	
				485					490					495	

<210>7

<211>1002

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 7

```

atttcttgtg gctctctctc gcctatccta aatggccgga ttagttatta ttctaccccc 60
attgctgttg gtaccgtgat aaggtagagt tgttcaggta ccttccgcct cattggagaa 120
aaaagtctat tatgcataac taaagacaaa gtggatggaa cctgggataa acctgctcct 180
aaatgtgaat atttcaataa atattcttct tgcctgagc ccatagtacc aggaggatac 240
aaaattagag gctctacacc ctacagacat ggtgattctg tgacatttgc ctgtaaaacc 300
aacttctcca tgaacggaaa caagtctggt tgggtgcaag caaataatat gtggggggccg 360
acacgactac caacctgtgt aagtgttttc cctctcgagt gtccagcact tcctatgatc 420
cacaatggac atcacacaag tgagaatggt ggctccattg ctccaggatt gtctgtgact 480
tacagctgtg aatctggtta cttgcttgtt ggagaaaaga tcattaactg tttgtcttcg 540
ggaaaatgga gtgctgtccc cccacatgt gaagaggcac gctgtaaatc tctaggacga 600
tttcccaatg ggaaggtaaa ggagcctcca attctccggg ttggtgtaac tgcaaacttt 660
ttctgtgatg aagggtatcg actgcaaggc ccacottcta gtcggtgtgt aattgctgga 720
cagggagtgt cttggaccaa aatgccagta tgttcaggag gaggaggttc cctgcagtgc 780
tacaactgtc ctaacccaac tgetgactgc aaaacagccg tcaattgttc atctgatttt 840
gatgcgtgtc tcattaccaa agctgggtta caagtgtata acaagtgttg gaagtgtgag 900
cattgcaatt tcaacgacgt cacaaccgcg ttgagggaaa atgagctaac gtactactgc 960
tgcaagaagg acctgtgtaa ctttaacgaa cagcttgaaa at 1002

```

10 <210>8

<211>334

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 8

ES 2 392 511 T3

Ile Ser Cys Gly Ser Pro Pro Pro Ile Leu Asn Gly Arg Ile Ser Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Ser Thr Pro Ile Ala Val Gly Thr Val Ile Arg Tyr Ser Cys Ser
 20 25 30

Gly Thr Phe Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Leu Leu Cys Ile Thr Lys
 35 40 45
 Asp Lys Val Asp Gly Thr Trp Asp Lys Pro Ala Pro Lys Cys Glu Tyr
 50 55 60
 Phe Asn Lys Tyr Ser Ser Cys Pro Glu Pro Ile Val Pro Gly Gly Tyr
 65 70 75 80
 Lys Ile Arg Gly Ser Thr Pro Tyr Arg His Gly Asp Ser Val Thr Phe
 85 90 95
 Ala Cys Lys Thr Asn Phe Ser Met Asn Gly Asn Lys Ser Val Trp Cys
 100 105 110
 Gln Ala Asn Asn Met Trp Gly Pro Thr Arg Leu Pro Thr Cys Val Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Glu Cys Pro Ala Leu Pro Met Ile His Asn Gly His
 130 135 140
 His Thr Ser Glu Asn Val Gly Ser Ile Ala Pro Gly Leu Ser Val Thr
 145 150 155 160
 Tyr Ser Cys Glu Ser Gly Tyr Leu Leu Val Gly Glu Lys Ile Ile Asn
 165 170 175
 Cys Leu Ser Ser Gly Lys Trp Ser Ala Val Pro Pro Thr Cys Glu Glu
 180 185 190
 Ala Arg Cys Lys Ser Leu Gly Arg Phe Pro Asn Gly Lys Val Lys Glu
 195 200 205
 Pro Pro Ile Leu Arg Val Gly Val Thr Ala Asn Phe Cys Asp Glu
 210 215 220
 Gly Tyr Arg Leu Gln Gly Pro Pro Ser Ser Arg Cys Val Ile Ala Gly
 225 230 235 240
 Gln Gly Val Ala Trp Thr Lys Met Pro Val Cys Ser Gly Gly Gly Gly
 245 250 255
 Ser Leu Gln Cys Tyr Asn Cys Pro Asn Pro Thr Ala Asp Cys Lys Thr
 260 265 270
 Ala Val Asn Cys Ser Ser Asp Phe Asp Ala Cys Leu Ile Thr Lys Ala
 275 280 285
 Gly Leu Gln Val Tyr Asn Lys Cys Trp Lys Phe Glu His Cys Asn Phe
 290 295 300
 Asn Asp Val Thr Thr Arg Leu Arg Glu Asn Glu Leu Thr Tyr Tyr Cys
 305 310 315 320
 Cys Lys Lys Asp Leu Cys Asn Phe Asn Glu Gln Leu Glu Asn
 325 330

<210>9

<211>1554

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 9

ES 2 392 511 T3

gactgtggcc ttccccaga tgtacctaat gccagccag ctttgggaagg ccgtacaagt 60
 ttccccgagg atactgtaat aacgtacaaa tgtgaagaaa gctttgtgaa aattcctggc 120
 gagaaggact cagtgatctg ccttaagggc agtcaatggc cagatattga agagttctgc 180
 aatcgtagct gcgaggtgcc aacaaggcta aattctgcat ccctcaaaca gccttatatc 240
 actcagaatt attttccagt cggactgtt gtggaatatg agtgccgtcc aggttacaga 300
 agagaacctt ctctatcacc aaaactaact tgccttcaga atttaaaatg gtccacagca 360
 gtcgaathtt gtaaaaagaa atcatgcctt aatccgggag aaatacgaaa tggtcagatt 420
 gatgtaccag gtggcatatt atttgggtgca accatctcct tctcatgtaa cacaggggtac 480
 aaattathtt gctcgacttc tagtttttgt cttatttcag gcagctctgt ccagtgagg 540
 gaccctgtgc cagagtgcag agaaatttat tgtccagcac caccacaaat tgacaatgga 600
 ataattcaag gggaacgtga ccattatgga tatagacagt ctgtaacgta tgcattgta 660

aaaggattca ccatgattgg agagcactct atttattgta ctgtgaataa tgatgaagga 720
 gagtggagtg gccaccacc tgaatgcaga tctctgggtg gcggtggctc gggcggagg 780
 gggctgggtg gcggcggatc catttcttgt ggctctcctc cgctatcctt aatggccgg 840
 attagttatt attctacccc cattgctgtt ggtaccgtga taaggtagag ttgttcagg 900
 acctccgcc tcattggaga aaaaagtcta ttatgcataa ctaaagacaa agtggatgga 960
 acctgggata aacctgctcc taaatgtgaa tatttcaata aatattcttc ttgccctgag 1020
 cccatagtac caggaggata caaaattaga ggctctacac cctacagaca tgggtgattct 1080
 gtgacatttg cctgtaaaac caacttctcc atgaacggaa acaagtctgt ttggtgtcaa 1140
 gcaataata tgtgggggcc gacacgacta ccaacctgtg taagtgtttt ccctctcgag 1200
 tgtccagcac ttctatgat ccacaatgga catcacacaa gtgagaatgt tggctccatt 1260
 gctccaggat tgtctgtgac ttacagctgt gaatctgggt acttgcttgt tggagaaaag 1320
 atcattaact gtttgtcttc gggaaaatgg agtgctgtcc cccccacatg tgaagaggca 1380
 cgctgtaaat ctctaggacg atttcccaat ggggaaggtaa aggagcctcc aattctccgg 1440
 gttgggtgaa ctgcaactt tttctgtgat gaagggtatc gactgcaagg cccaccttct 1500
 agtcggtgtg taattgctgg acagggagtt gcttggacca aaatgccagt atgt 1554

<210> 10

<211> 518

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 10

ES 2 392 511 T3

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

ES 2 392 511 T3

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

<210> 11

<211>990

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 11

ES 2 392 511 T3

```
ctgcagtgct acaactgtcc taoccoaact gctgactgca aaacagccgt caattgttca 60
tctgattttg atgcgtgtct cattaccaa gctgggttac aagtgtataa caagtgttgg 120
aagtttgagc attgcaattt caacgacgtc acaaccgct tgagggaaaa tgagctaacg 180
tactactgct gcaagaagga cctgtgtaac tttaacgaac agcttgaaaa ttctcttggg 240
ggcgggtggc cgggaggagg tgggtccggg ggcggcggat ccatttcttg tggctctcct 300
ccgcctatcc taaatggccg gattagttat tattctaccc ccattgctgt tggtagcgtg 360
ataaggtaca gttggtcagg taccttccgc ctattggag aaaaaagtct attatgcata 420
actaaagaca aagtggatgg aacctgggat aaacctgctc ctaaatgtga atatttcaat 480
aatattctt cttgccctga gcccatagta ccaggaggat acaaaattag aggctctaca 540
ccctacagac atgggtgattc tgtgacattt gcctgtaaaa ccaacttctc catgaacgga 600
aacaagtctg tttggtgtca agcaataat atgtgggggc cgacacgact accaacctgt 660
gtaagtgtt tccctctcga gtgtccagca ctctctatga tccacaatgg acatcacaca 720
agtgagaatg ttggctccat tgctccagga ttgtctgtga cttacagctg tgaatctggg 780
tacttgcttg ttggagaaaa gatcattaac tgtttgtctt cgggaaaatg gagtgctgtc 840
ccccccacat gtgaagaggc acgctgtaaa tctctaggac gatttccaa tgggaaggta 900
aaggagctc caattctccg ggttggtgta actgcaaact ttttctgtga tgaagggtat 960
cgactgcaag gcccaccttc tagtcgggtg 990
```

<210> 12

<211>330

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 12

Leu	Gln	Cys	Tyr	Asn	Cys	Pro	Asn	Pro	Thr	Ala	Asp	Cys	Lys	Thr	Ala
1				5					10					15	
Val	Asn	Cys	Ser	Ser	Asp	Phe	Asp	Ala	Cys	Leu	Ile	Thr	Lys	Ala	Gly
			20					25					30		
Leu	Gln	Val	Tyr	Asn	Lys	Cys	Trp	Lys	Phe	Glu	His	Cys	Asn	Phe	Asn
		35					40					45			
Asp	Val	Thr	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Asn	Glu	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Cys
	50					55					60				
Lys	Lys	Asp	Leu	Cys	Asn	Phe	Asn	Glu	Gln	Leu	Glu	Asn	Ser	Ser	Gly
65					70					75					80
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser
				85					90					95	
Cys	Gly	Ser	Pro	Pro	Pro	Ile	Leu	Asn	Gly	Arg	Ile	Ser	Tyr	Tyr	Ser
			100					105					110		
Thr	Pro	Ile	Ala	Val	Gly	Thr	Val	Ile	Arg	Tyr	Ser	Cys	Ser	Gly	Thr
		115					120					125			
Phe	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Leu	Cys	Ile	Thr	Lys	Asp	Lys
	130					135					140				
Val	Asp	Gly	Thr	Trp	Asp	Lys	Pro	Ala	Pro	Lys	Cys	Glu	Tyr	Phe	Asn
145					150					155					160
Lys	Tyr	Ser	Ser	Cys	Pro	Glu	Pro	Ile	Val	Pro	Gly	Gly	Tyr	Lys	Ile
				165					170					175	
Arg	Gly	Ser	Thr	Pro	Tyr	Arg	His	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Phe	Ala	Cys
			180					185					190		
Lys	Thr	Asn	Phe	Ser	Met	Asn	Gly	Asn	Lys	Ser	Val	Trp	Cys	Gln	Ala
		195					200					205			
Asn	Asn	Met	Trp	Gly	Pro	Thr	Arg	Leu	Pro	Thr	Cys	Val	Ser	Val	Phe
	210					215					220				
Pro	Leu	Glu	Cys	Pro	Ala	Leu	Pro	Met	Ile	His	Asn	Gly	His	His	Thr
225					230					235					240
Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Ser	Ile	Ala	Pro	Gly	Leu	Ser	Val	Thr	Tyr	Ser
				245					250					255	
Cys	Glu	Ser	Gly	Tyr	Leu	Leu	Val	Gly	Glu	Lys	Ile	Ile	Asn	Cys	Leu
			260					265					270		
Ser	Ser	Gly	Lys	Trp	Ser	Ala	Val	Pro	Pro	Thr	Cys	Glu	Glu	Ala	Arg
		275					280					285			
Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Arg	Phe	Pro	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Glu	Pro	Pro
	290					295					300				
Ile	Leu	Arg	Val	Gly	Val	Thr	Ala	Asn	Phe	Phe	Cys	Asp	Glu	Gly	Tyr
305					310					315					320
Arg	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro	Ser	Ser	Arg	Cys						
				325					330						

<210> 13

<211> 5994

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 13

caatgcaatg cccagaatg gcttccattt gccaggccta ccaacctaac tgatgagttt 60
 gagtttccca ttgggacata tctgaactat gaatgcggcc ctgggtattc cggaagaccg 120
 ttttctatca tctgcctaaa aaactcagtc tggactgggtg ctaaggacag gtgcagacgt 180
 aaatcatgtc gtaatcctcc agatcctgtg aatggcatgg tgcattgtgat caaaggcatc 240
 cagttcggat cccaaattaa atattcttgt actaaaggat accgactcat tggttcctcg 300
 tctgccacat gcatcatctc aggtgatact gtcatttggg ataatgaaac acctatttgt 360
 gacagaattc cttgtgggct acccccacc ataccaatg gagatttcat tagcaccaac 420
 agagagaatt ttcactatgg atcagtgggtg acctaccgct gcaatcctgg aagcggaggg 480
 agaaaagggtg ttgagcttgt gggtgagccc tccatatact gcaccagcaa tgacgatcaa 540
 gtgggcatct ggagcggccc cgcccctcag tgcattatac ctaacaaatg cacgcctcca 600
 aatgtggaaa atggaatatt ggtatctgac aacagaagct tattttcctt aaatgaagtt 660
 gtggagttaa ggtgtcagcc tggctttgtc atgaaaggac cccgcctgtg gaagtgccag 720
 gccctgaaca aatgggagcc ggagctacca agctgctcca gggtatgtca gccacctcca 780
 gatgtcctgc atgctgagcg tacccaaagg gacaaggaca acttttcacc tgggcaggaa 840
 gtgttctaca gctgtgagcc cggtacgac ctgagagggg ctgctctat gcgctgcaca 900
 cccagggag actggagccc tgcagcccc acatgtgaag tgaaatcctg tgatgacttc 960
 atgggccaac ttcttaatgg ccgtgtgcta tttccagtaa atctccagct tggagcaaaa 1020
 gtggattttg tttgtgatga aggatttcaa ttaaaaggca gctctgctag ttactgtgtc 1080
 ttggctggaa tggaaagcct ttggaatagc agtgttccag tgtgtgaaca aatcttttgt 1140
 ccaagtcctc cagttattcc taatgggaga cacacaggaa aacctctgga agtctttccc 1200
 tttggaaaag cagtaattaa cacatgcgac cccacccag acagaggggac gagcttcgac 1260
 ctcatggag agagcaccat ccgctgcaca agtgaccctc aagggaatgg ggtttggagc 1320
 agccctgccc ctgctgtgg aattctgggt cactgtcaag ccccgatca ttttctgtt 1380
 gccaaagtga aaacccaaac caatgcactc gactttccca ttgggacatc tttaaagtac 1440
 gaatgccgtc ctgagtacta cgggaggcca ttctctatca catgtctaga taacctggtc 1500
 tggtaagtct ccaaagatgt ctgtaaagct aaactcctcc agatccagtg 1560
 aatggcatgg tgcattgtat cacagacatc caggttggat ccagaatcaa ctattcttgt 1620
 actacagggc accgactcat tggctactca tctgctgaat gtatcctctc gggcaatgct 1680
 gccattgga gcacgaagcc gccaatttgt caacgaatc cttgtgggct acccccacc 1740
 atcgccaatg gagatttcat tagcaccaac agagagaatt ttcactatgg atcagtgggtg 1800
 acctaccgct gcaatcctgg aagcggaggg agaaagggtg ttgagcttgt gggtgagccc 1860
 tccatatact gcaccagcaa tgacgatcaa gtgggcatct ggagcggccc ggcccctcag 1920
 tgcattatac ctaacaaatg cacgcctcca aatgtggaaa atggaatatt ggtatctgac 1980
 aacagaagct tattttcctt aaatgaagtt gtggagttaa ggtgtcagcc tggctttgtc 2040
 atgaaaggac cccgcctgtg gaagtgccag gccctgaaca aatgggagcc ggagctacca 2100
 agctgctcca gggatgtca gccacctcca gatgtcctgc atgctgagcg tacccaaagg 2160
 gacaaggaca acttttcacc cgggcaggaa gtgttctaca gctgtgagcc cggctatgac 2220
 ctgagagggg ctgctctat gcgctgcaca cccagggag actggagccc tgcagcccc 2280
 acatgtgaag tgaaatcctg tgatgacttc atgggccaac ttcttaatgg ccgtgtgcta 2340
 tttccagtaa atctccagct tggagcaaaa gtggattttg tttgtgatga aggatttcaa 2400
 ttaaaaggca gctctgctag ttattgtgtc ttggctggaa tggaaagcct ttggaatagc 2460
 agtgttccag tgtgtgaaca aatcttttgt ccaagtcctc cagttattcc taatgggaga 2520
 cacacaggaa aacctctgga agtctttccc tttggaaaag cagtaattaa cacatgcgac 2580
 cccacccag acagagggac gagcttcgac ctcatggag agagcaccat ccgctgcaca 2640
 agtgaccctc aagggaatgg ggtttggagc agcctgccc ctgctgtgg aattctgggt 2700
 cactgtcaag ccccgatca ttttctgtt gccaaagtga aaacccaaac caatgcactc 2760
 gactttccca ttgggacatc tttaaagtac gaatgccgtc ctgagtacta cgggaggcca 2820
 ttctctatca catgtctaga taacctggtc tggtaagtc ccaaagatgt ctgtaaactg 2880
 aaatcatgta aaactcctcc agatccagtg aatggcatgg tgcattgtgat cacagacatc 2940
 caggttggat ccagaatcaa ctattcttgt actacagggc accgactcat tggctactca 3000
 tctgctgaat gtatcctctc aggcaatact gccattgga gcacgaagcc gccaatttgt 3060
 caacgaattc cttgtgggct acccccacc atcgccaatg gagatttcat tagcaccaac 3120
 agagagaatt ttcactatgg atcagtgggtg acctaccgct gcaatcttgg aagcagaggg 3180
 agaaaagggtg ttgagcttgt gggtgagccc tccatatact gcaccagcaa tgacgatcaa 3240
 gtgggcatct ggagcggccc cgcccctcag tgcattatac ctaacaaatg cacgcctcca 3300
 aatgtggaaa atggaatatt ggtatctgac aacagaagct tattttcctt aaatgaagtt 3360

```

gtggagttta ggtgtcagcc tggctttgtc atgaaaggac cccgccgtgt gaagtgccag 3420
gccctgaaca aatgggagcc agagttacca agctgtccca ggggtgtgtca gccgcctcca 3480
gaaatcctgc atggtgagca taccccaagc catcaggaca acttttcacc tgggcaggaa 3540
gtgtttetaca gctgtgagcc tggctatgac ctgagagggg ctgctctct gcactgcaca 3600
ccccagggag actggagccc tgaagccccg agatgtgcag tgaatcctg tgatgacttc 3660
ttgggtcaac tccctcatgg ccgtgtgcta tttccactta atctccagct tggggcaaag 3720
gtgtcctttg tctgtgatga agggtttcgc ttaaagggca gttccgtag tcattgtgtc 3780
ttggttggaa tgagaagcct ttggaataac agtgttctcg tgtgtgaaca tatcttttgt 3840
ccaaatcctc cagctatcct taatgggaga cacacaggaa ctccctctgg agatattccc 3900
tatggaaaag aaatatctta cacatgtgac cccaccag acagagggat gaccttcaac 3960
ctcattgggg agagcaccat ccgctgcaca agtgaccctc atgggaatgg ggtttggagc 4020
agccctgccc ctgctgtga actttctgtt cgtgctggtc actgtaaaac cccagagcag 4080
tttccatttg ccagtcctac gatcccaatt aatgactttg agtttccagt cgggacatct 4140
ttgaattatg aatgccgtcc tgggtatttt gggaaaatgt tctctatctc ctgcctagaa 4200
aacttgggtc ggtcaagtgt tgaagacaac tgtagacgaa aatcatgtgg acctccacca 4260
gaacccttca atggaatggg gcatataaac acagatacac agtttggatc aacagttaat 4320
tattcttgta atgaaggggt tcgactcatt ggttccccat ctactacttg tctcgtctca 4380
ggcaataatg tcacatggga taagaaggca cctatttgtg agatcatatc ttgtgagcca 4440
cctccaacca tatccaatgg agacttctac agcaacaata gaacatcttt tcacaatgga 4500
acgggtggtaa cttaccagtg ccacactgga ccagatggag aacagctgtt tgagcttgtg 4560
ggagaacggg caatatattg caccagcaa gatgatcaag ttggtgtttg gagcagccct 4620
ccccctcggg gtatttctac taataaatgc acagctccag aagttgaaaa tgcaattaga 4680
gtaccaggaa acaggagttt cttttccctc actgagatca tcagatttag atgtcagccc 4740
gggtttgtca tggtagggtc ccacactgtg cagtcccaga ccaatggcag atggggggccc 4800
aagctgccac actgctccag ggtgtgtcag ccgctccag aaatcctgca tgggtgagcat 4860
accctaagcc atcaggacaa cttttcacct gggcaggaag tgttctacag ctgtgagccc 4920
agctatgacc tcagaggggc tgcgtctctg cactgcacgc cccagggaga ctggagccct 4980
gaagccccta gatgtacagt gaaatcctgt gatgacttcc tgggccaact cctcatggc 5040
cgtgtgtctac ttccacttaa tctccagctt ggggcaaagg tgtcctttgt ttgcatgaa 5100
gggttccgat taaaaggcag gtctgtctagt cattgtgtct tggctggaat gaaagccctt 5160
tggaaatagca gtgttccagt gtgtgaacaa atcttttgtc caaatcctcc agctatcctt 5220
aatgggagac acacaggaac tccctttgga gatattccct atggaaaaga aatatcttac 5280
gcatgcgaca cccaccaga cagagggatg accttcaacc tcattgggga gagctccatc 5340
cgctgcacaa gtgaccctca agggaatggg gtttggagca gccctgcccc tcgctgtgaa 5400
ctttctgttc ctgctgcctg cccacatcca cccaagatcc aaaacgggca ttacattgga 5460
ggacacgtat ctctatatct tcttgggatg acaatcagct acaattgtga ccccggtctac 5520
ctgttagtgg gaaagggctt cattttctgt acagaccagg gaatctggag ccaattggat 5580
cattattgca aagaagtata ttgtagcttc ccactgttta tgaatggaat ctcgaaggag 5640
ttagaaatga aaaaagtata tcactatgga gattatgtga ctttgaagtg tgaagatggg 5700
tatactctgg aaggcagtc ctggagccag tgccaggcgg atgacagatg ggaccctcct 5760
ctggccaaat gtacctctcg tgcacatgat gctctcatag ttggcacttt atctggtacg 5820
atcttcttta ttttactcat cattttctc tcttggataa ttctaaagca cagaaaaggc 5880
aataatgcac atgaaaacc taaagaagtg gctatccatt tacattctca aggaggcagc 5940
agcgttcatc cccgaactct gcaacaacaa gaagaaaata gcagggtcct tcct 5994

```

<210> 14

<211>2048

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 14

```

Met Cys Leu Gly Arg Met Gly Ala Ser Ser Pro Arg Ser Pro Glu Pro
 1           5           10           15
Val Gly Pro Pro Ala Pro Gly Leu Pro Phe Cys Cys Gly Gly Ser Leu
          20           25           30

```

ES 2 392 511 T3

Leu Ala Val Val Val Leu Leu Ala Leu Pro Val Ala Trp Gly Gln Cys
 35 40 45
 Asn Ala Gln Cys Asn Ala Pro Glu Trp Leu Pro Phe Ala Arg Pro Thr
 50 55 60
 Asn Leu Thr Asp Glu Phe Glu Phe Pro Ile Gly Thr Tyr Leu Asn Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Arg Pro Gly Tyr Ser Gly Arg Pro Phe Ser Ile Ile Cys Leu
 85 90 95
 Lys Asn Ser Val Trp Thr Gly Ala Lys Asp Arg Cys Arg Arg Lys Ser
 100 105 110
 Cys Arg Asn Pro Pro Asp Pro Val Asn Gly Met Val His Val Ile Lys
 115 120 125
 Gly Ile Gln Phe Gly Ser Ser Gln Ile Lys Tyr Ser Cys Thr Lys Gly Tyr
 130 135 140
 Arg Leu Ile Gly Ser Ser Ala Thr Cys Ile Ser Gly Asp Thr
 145 150 155 160
 Val Ile Trp Asp Asn Glu Thr Pro Ile Cys Asp Arg Ile Pro Cys Gly
 165 170 175
 Leu Pro Pro Thr Ile Thr Asn Gly Asp Phe Ile Ser Thr Asn Arg Glu
 180 185 190
 Asn Phe His Tyr Gly Ser Val Val Thr Tyr Arg Cys Asn Pro Gly Ser
 195 200 205
 Gly Gly Arg Lys Val Phe Glu Leu Val Gly Glu Pro Ser Ile Tyr Cys
 210 215 220
 Thr Ser Asn Asp Asp Gln Val Gly Ile Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gln
 225 230 235 240
 Cys Ile Ile Pro Asn Lys Cys Thr Pro Pro Asn Val Glu Asn Gly Ile
 245 250 255
 Leu Val Ser Asp Asn Arg Ser Leu Phe Ser Leu Asn Glu Val Val Glu
 260 265 270
 Phe Arg Cys Gln Pro Gly Phe Val Met Lys Gly Pro Arg Arg Val Lys
 275 280 285
 Cys Gln Ala Leu Asn Lys Trp Glu Pro Glu Leu Pro Ser Cys Ser Arg
 290 295 300
 Val Cys Gln Pro Pro Pro Asp Val Leu His Ala Glu Arg Thr Gln Arg
 305 310 315 320
 Asp Lys Asp Asn Phe Ser Pro Gly Gln Glu Val Phe Tyr Ser Cys Glu
 325 330 335
 Pro Gly Tyr Asp Leu Arg Gly Ala Ala Ser Met Arg Cys Thr Pro Gln
 340 345 350
 Gly Asp Trp Ser Pro Ala Ala Pro Thr Cys Glu Val Lys Ser Cys Asp
 355 360 365
 Asp Phe Met Gly Gln Leu Leu Asn Gly Arg Val Leu Phe Pro Val Asn
 370 375 380
 Leu Gln Leu Gly Ala Lys Val Asp Phe Val Cys Asp Glu Gly Phe Gln
 385 390 395 400
 Leu Lys Gly Ser Ser Ala Ser Tyr Cys Val Leu Ala Gly Met Glu Ser
 405 410 415
 Leu Trp Asn Ser Ser Val Pro Val Cys Glu Gln Ile Phe Cys Pro Ser
 420 425 430
 Pro Pro Val Ile Pro Asn Gly Arg His Thr Gly Lys Pro Leu Glu Val
 435 440 445
 Phe Pro Phe Gly Lys Ala Val Asn Tyr Thr Cys Asp Pro His Pro Asp
 450 455 460
 Arg Gly Thr Ser Phe Asp Leu Ile Gly Glu Ser Thr Ile Arg Cys Thr
 465 470 475 480
 Ser Asp Pro Gln Gly Asn Gly Val Trp Ser Ser Pro Ala Pro Arg Cys
 485 490 495
 Gly Ile Leu Gly His Cys Gln Ala Pro Asp His Phe Leu Phe Ala Lys
 500 505 510

ES 2 392 511 T3

Leu Lys Thr Gln Thr Asn Ala Ser Asp Phe Pro Ile Gly Thr Ser Leu
 515 520 525
 Lys Tyr Glu Cys Arg Pro Glu Tyr Tyr Gly Arg Pro Phe Ser Ile Thr
 530 535 540
 Cys Leu Asp Asn Leu Val Trp Ser Ser Pro Lys Asp Val Cys Lys Arg
 545 550 555 560
 Lys Ser Cys Lys Thr Pro Pro Asp Pro Val Asn Gly Met Val His Val
 565 570 575
 Ile Thr Asp Ile Gln Val Gly Ser Arg Ile Asn Tyr Ser Cys Thr Thr
 580 585 590
 Gly His Arg Leu Ile Gly His Ser Ser Ala Glu Cys Ile Leu Ser Gly
 595 600 605
 Asn Ala Ala His Trp Ser Thr Lys Pro Pro Ile Cys Gln Arg Ile Pro
 610 615 620
 Cys Gly Leu Pro Pro Thr Ile Ala Asn Gly Asp Phe Ile Ser Thr Asn
 625 630 635 640
 Arg Glu Asn Phe His Tyr Gly Ser Val Val Thr Tyr Arg Cys Asn Pro
 645 650 655
 Gly Ser Gly Gly Arg Lys Val Phe Glu Leu Val Gly Glu Pro Ser Ile
 660 665 670
 Tyr Cys Thr Ser Asn Asp Asp Gln Val Gly Ile Trp Ser Gly Pro Ala
 675 680 685
 Pro Gln Cys Ile Ile Pro Asn Lys Cys Thr Pro Pro Asn Val Glu Asn
 690 695 700
 Gly Ile Leu Val Ser Asp Asn Arg Ser Leu Phe Ser Leu Asn Glu Val
 705 710 715 720
 Val Glu Phe Arg Cys Gln Pro Gly Phe Val Met Lys Gly Pro Arg Arg
 725 730 735
 Val Lys Cys Gln Ala Leu Asn Lys Trp Glu Pro Glu Leu Pro Ser Cys
 740 745 750
 Ser Arg Val Cys Gln Pro Pro Pro Asp Val Leu His Ala Glu Arg Thr
 755 760 765
 Gln Arg Asp Lys Asp Asn Phe Ser Pro Gly Gln Glu Val Phe Tyr Ser
 770 775 780
 Cys Glu Pro Gly Tyr Asp Leu Arg Gly Ala Ala Ser Met Arg Cys Thr
 785 790 795 800
 Pro Gln Gly Asp Trp Ser Pro Ala Ala Pro Thr Cys Glu Val Lys Ser
 805 810 815
 Cys Asp Asp Phe Met Gly Gln Leu Leu Asn Gly Arg Val Leu Phe Pro
 820 825 830
 Val Asn Leu Gln Leu Gly Ala Lys Val Asp Phe Val Cys Asp Glu Gly
 835 840 845
 Phe Gln Leu Lys Gly Ser Ser Ala Ser Tyr Cys Val Leu Ala Gly Met
 850 855 860
 Glu Ser Leu Trp Asn Ser Ser Val Pro Val Cys Glu Gln Ile Phe Cys
 865 870 875 880
 Pro Ser Pro Pro Val Ile Pro Asn Gly Arg His Thr Gly Lys Pro Leu
 885 890 895
 Glu Val Phe Pro Phe Gly Lys Ala Val Asn Tyr Thr Cys Asp Pro His
 900 905 910
 Pro Asp Arg Gly Thr Ser Phe Asp Leu Ile Gly Glu Ser Thr Ile Arg
 915 920 925
 Cys Thr Ser Asp Pro Gln Gly Asn Gly Val Trp Ser Ser Pro Ala Pro
 930 935 940
 Arg Cys Gly Ile Leu Gly His Cys Gln Ala Pro Asp His Phe Leu Phe
 945 950 955 960
 Ala Lys Leu Lys Thr Gln Thr Asn Ala Ser Asp Phe Pro Ile Gly Thr
 965 970 975
 Ser Leu Lys Tyr Glu Cys Arg Pro Glu Tyr Tyr Gly Arg Pro Phe Ser
 980 985 990

ES 2 392 511 T3

Ile Thr Cys Leu Asp Asn Leu Val Trp Ser Ser Pro Lys Asp Val Cys
995 1000 1005
Lys Arg Lys Ser Cys Lys Thr Pro Pro Asp Pro Val Asn Gly Met Val
1010 1015 1020
His Val Ile Thr Asp Ile Gln Val Gly Ser Arg Ile Asn Tyr Ser Cys
1025 1030 1035 1040
Thr Thr Gly His Arg Leu Ile Gly His Ser Ser Ala Glu Cys Ile Leu
1045 1050 1055
Ser Gly Asn Thr Ala His Trp Ser Thr Lys Pro Pro Ile Cys Gln Arg
1060 1065 1070
Ile Pro Cys Gly Leu Pro Pro Thr Ile Ala Asn Gly Asp Phe Ile Ser
1075 1080 1085
Thr Asn Arg Glu Asn Phe His Tyr Gly Ser Val Thr Tyr Arg Cys
1090 1095 1100
Asn Leu Gly Ser Arg Gly Arg Lys Val Phe Glu Leu Val Gly Glu Pro
1105 1110 1115 1120
Ser Ile Tyr Cys Thr Ser Asn Asp Asp Gln Val Gly Ile Trp Ser Gly
1125 1130 1135
Pro Ala Pro Gln Cys Ile Ile Pro Asn Lys Cys Thr Pro Pro Asn Val
1140 1145 1150
Glu Asn Gly Ile Leu Val Ser Asp Asn Arg Ser Leu Phe Ser Leu Asn
1155 1160 1165
Glu Val Val Glu Phe Arg Cys Gln Pro Gly Phe Val Met Lys Gly Pro
1170 1175 1180
Arg Arg Val Lys Cys Gln Ala Leu Asn Lys Trp Glu Pro Glu Leu Pro
1185 1190 1195 1200
Ser Cys Ser Arg Val Cys Gln Pro Pro Pro Glu Ile Leu His Gly Glu
1205 1210 1215
His Thr Pro Ser His Gln Asp Asn Phe Ser Pro Gly Gln Glu Val Phe
1220 1225 1230
Tyr Ser Cys Glu Pro Gly Tyr Asp Leu Arg Gly Ala Ala Ser Leu His
1235 1240 1245
Cys Thr Pro Gln Gly Asp Trp Ser Pro Glu Ala Pro Arg Cys Ala Val
1250 1255 1260
Lys Ser Cys Asp Asp Phe Leu Gly Gln Leu Pro His Gly Arg Val Leu
1265 1270 1275 1280
Phe Pro Leu Asn Leu Gln Leu Gly Ala Lys Val Ser Phe Val Cys Asp
1285 1290 1295
Glu Gly Phe Arg Leu Lys Gly Ser Ser Val Ser His Cys Val Leu Val
1300 1305 1310
Gly Met Arg Ser Leu Trp Asn Asn Ser Val Pro Val Cys Glu His Ile
1315 1320 1325
Phe Cys Pro Asn Pro Pro Ala Ile Leu Asn Gly Arg His Thr Gly Thr
1330 1335 1340
Pro Ser Gly Asp Ile Pro Tyr Gly Lys Glu Ile Ser Tyr Thr Cys Asp
1345 1350 1355 1360
Pro His Pro Asp Arg Gly Met Thr Phe Asn Leu Ile Gly Glu Ser Thr
1365 1370 1375
Ile Arg Cys Thr Ser Asp Pro His Gly Asn Gly Val Trp Ser Ser Pro
1380 1385 1390
Ala Pro Arg Cys Glu Leu Ser Val Arg Ala Gly His Cys Lys Thr Pro
1395 1400 1405
Glu Gln Phe Pro Phe Ala Ser Pro Thr Ile Pro Ile Asn Asp Phe Glu
1410 1415 1420
Phe Pro Val Gly Thr Ser Leu Asn Tyr Glu Cys Arg Pro Gly Tyr Phe
1425 1430 1435 1440
Gly Lys Met Phe Ser Ile Ser Cys Leu Glu Asn Leu Val Trp Ser Ser
1445 1450 1455
Val Glu Asp Asn Cys Arg Arg Lys Ser Cys Gly Pro Pro Pro Glu Pro
1460 1465 1470

ES 2 392 511 T3

Phe Asn Gly Met Val His Ile Asn Thr Asp Thr Gln Phe Gly Ser Thr
 1475 1480 1485
 Val Asn Tyr Ser Cys Asn Glu Gly Phe Arg Leu Ile Gly Ser Pro Ser
 1490 1495 1500
 Thr Thr Cys Leu Val Ser Gly Asn Asn Val Thr Trp Asp Lys Lys Ala
 1505 1510 1515 1520
 Pro Ile Cys Glu Ile Ile Ser Cys Glu Pro Pro Pro Thr Ile Ser Asn
 1525 1530 1535
 Gly Asp Phe Tyr Ser Asn Asn Arg Thr Ser Phe His Asn Gly Thr Val
 1540 1545 1550
 Val Thr Tyr Gln Cys His Thr Gly Pro Asp Gly Glu Gln Leu Phe Glu
 1555 1560 1565
 Leu Val Gly Glu Arg Ser Ile Tyr Cys Thr Ser Lys Asp Asp Gln Val
 1570 1575 1580
 Gly Val Trp Ser Ser Pro Pro Arg Cys Ile Ser Thr Asn Lys Cys
 1585 1590 1595 1600
 Thr Ala Pro Glu Val Glu Asn Ala Ile Arg Val Pro Gly Asn Arg Ser
 1605 1610 1615
 Phe Phe Ser Leu Thr Glu Ile Ile Arg Phe Arg Cys Gln Pro Gly Phe
 1620 1625 1630
 Val Met Val Gly Ser His Thr Val Gln Cys Gln Thr Asn Gly Arg Trp
 1635 1640 1645
 Gly Pro Lys Leu Pro His Cys Ser Arg Val Cys Gln Pro Pro Pro Glu
 1650 1655 1660
 Ile Leu His Gly Glu His Thr Leu Ser His Gln Asp Asn Phe Ser Pro
 1665 1670 1675 1680
 Gly Gln Glu Val Phe Tyr Ser Cys Glu Pro Ser Tyr Asp Leu Arg Gly
 1685 1690 1695
 Ala Ala Ser Leu His Cys Thr Pro Gln Gly Asp Trp Ser Pro Glu Ala
 1700 1705 1710
 Pro Arg Cys Thr Val Lys Ser Cys Asp Asp Phe Leu Gly Gln Leu Pro
 1715 1720 1725
 His Gly Arg Val Leu Leu Pro Leu Asn Leu Gln Leu Gly Ala Lys Val
 1730 1735 1740
 Ser Phe Val Cys Asp Glu Gly Phe Arg Leu Lys Gly Arg Ser Ala Ser
 1745 1750 1755 1760
 His Cys Val Leu Ala Gly Met Lys Ala Leu Trp Asn Ser Ser Val Pro
 1765 1770 1775
 Val Cys Glu Gln Ile Phe Cys Pro Asn Pro Pro Ala Ile Leu Asn Gly
 1780 1785 1790
 Arg His Thr Gly Thr Pro Phe Gly Asp Ile Pro Tyr Gly Lys Glu Ile
 1795 1800 1805
 Ser Tyr Ala Cys Asp Thr His Pro Asp Arg Gly Met Thr Phe Asn Leu
 1810 1815 1820
 Ile Gly Glu Ser Ser Ile Arg Cys Thr Ser Asp Pro Gln Gly Asn Gly
 1825 1830 1835 1840
 Val Trp Ser Ser Pro Ala Pro Arg Cys Glu Leu Ser Val Pro Ala Ala
 1845 1850 1855
 Cys Pro His Pro Pro Lys Ile Gln Asn Gly His Tyr Ile Gly Gly His
 1860 1865 1870
 Val Ser Leu Tyr Leu Pro Gly Met Thr Ile Ser Tyr Thr Cys Asp Pro
 1875 1880 1885
 Gly Tyr Leu Leu Val Gly Lys Gly Phe Ile Phe Cys Thr Asp Gln Gly
 1890 1895 1900
 Ile Trp Ser Gln Leu Asp His Tyr Cys Lys Glu Val Asn Cys Ser Phe
 1905 1910 1915 1920
 Pro Leu Phe Met Asn Gly Ile Ser Lys Glu Leu Glu Met Lys Lys Val
 1925 1930 1935
 Tyr His Tyr Gly Asp Tyr Val Thr Leu Lys Cys Glu Asp Gly Tyr Thr
 1940 1945 1950

ES 2 392 511 T3

Leu Glu Gly Ser Pro Trp Ser Gln Cys Gln Ala Asp Asp Arg Trp Asp
 1955 1960 1965
 Pro Pro Leu Ala Lys Cys Thr Ser Arg Ala His Asp Ala Leu Ile Val
 1970 1975 1980
 Gly Thr Leu Ser Gly Thr Ile Phe Phe Ile Leu Leu Ile Ile Phe Leu
 1985 1990 1995 2000
 Ser Trp Ile Ile Leu Lys His Arg Lys Gly Asn Asn Ala His Glu Asn
 2005 2010 2015
 Pro Lys Glu Val Ala Ile His Leu His Ser Gln Gly Gly Ser Ser Val
 2020 2025 2030
 His Pro Arg Thr Leu Gln Thr Asn Glu Glu Asn Ser Arg Val Leu Pro
 2035 2040 2045

<210> 15

<211> 1029

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 15

```
tgtgaggagc caccaacatt tgaagctatg gagctcattg gtaaaccaaa accctactat 60
gagattgggtg aacgagtaga ttataagtgt aaaaaaggat acttctatat acctcctctt 120
gccacccata ctatttgtga tcggaatcat acatggctac ctgtctcaga tgacgcctgt 180
tatagagaaa catgtccata tatacgggat cctttaaatg gccaaagcagt ccttgcaaat 240
gggacttacg agtttggtta tcagatgcac tttatttgta atgagggtta ttacttaatt 300
ggggaagaaa ttctatattg tgaacttaaa ggatcagtag caatttggag cggtaagccc 360
ccaatatgtg aaaaggtttt gtgtacacca cctccaaaaa taaaaaatgg aaaacacacc 420
tttagtgaag tagaagtatt tgagtatctt gatgcagtaa cttatagtgt tgatcctgca 480
cctggaccag atccattttc acttattgga gagagcacga tttattgtgg tgacaattca 540
gtgtggagtc gtgctgctcc agagtgtaaa gtggtcaaat gtcgatttcc agtagtcgaa 600
aatggaaaac agatatcagg atttggaaaa aaattttact acaaagcaac agttatgttt 660
gaatgcgata agggttttta cctcgatggc agcgacacaa ttgtctgtga cagtaacagt 720
acttgggatc ccccagttcc aaagtgtctt aaagtgtcga cttcttccac tacaaaatct 780
ccagcgtcca gtgcctcagg tcctaggcct acttacaagc ctccagtctc aaattatcca 840
ggatatacta aacctgagga aggaatactt gacagtttgg atgtttgggt cattgctgtg 900
attgttattg ccatagtgtg tggagttgca gtaatttgtg ttgtcccgta cagatatctt 960
caaaggagga agaagaaagg cacataccta actgatgaga cccacagaga agtaaaattt 1020
acttctctc 1029
```

10 <210> 16

<211>378

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 16

ES 2 392 511 T3

Met Glu Pro Pro Gly Arg Arg Glu Cys Pro Phe Pro Ser Trp Arg Phe
 1 5 10 15
 Phe Pro Gly Leu Leu Leu Ala Ala Met Val Leu Leu Leu Tyr Ser Phe
 20 25 30
 Ser Asp Ala Cys Glu Glu Pro Pro Thr Phe Glu Ala Met Glu Leu Ile
 35 40 45
 Gly Lys Pro Lys Pro Tyr Tyr Glu Ile Gly Glu Arg Val Asp Tyr Lys
 50 55 60

Cys Lys Lys Gly Tyr Phe Tyr Ile Pro Pro Leu Ala Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 Cys Asp Arg Asn His Thr Trp Leu Pro Val Ser Asp Asp Ala Cys Tyr
 85 90 95
 Arg Glu Thr Cys Pro Tyr Ile Arg Asp Pro Leu Asn Gly Gln Ala Val
 100 105 110
 Pro Ala Asn Gly Thr Tyr Glu Phe Gly Tyr Gln Met His Phe Ile Cys
 115 120 125
 Asn Glu Gly Tyr Tyr Leu Ile Gly Glu Glu Ile Leu Tyr Cys Glu Leu
 130 135 140
 Lys Gly Ser Val Ala Ile Trp Ser Gly Lys Pro Pro Ile Cys Glu Lys
 145 150 155 160
 Val Leu Cys Thr Pro Pro Pro Lys Ile Lys Asn Gly Lys His Thr Phe
 165 170 175
 Ser Glu Val Glu Val Phe Glu Tyr Leu Asp Ala Val Thr Tyr Ser Cys
 180 185 190
 Asp Pro Ala Pro Gly Pro Asp Pro Phe Ser Leu Ile Gly Glu Ser Thr
 195 200 205
 Ile Tyr Cys Gly Asp Asn Ser Val Trp Ser Arg Ala Ala Pro Glu Cys
 210 215 220
 Lys Val Val Lys Cys Arg Phe Pro Val Val Glu Asn Gly Lys Gln Ile
 225 230 235 240
 Ser Gly Phe Gly Lys Lys Phe Tyr Tyr Lys Ala Thr Val Met Phe Glu
 245 250 255
 Cys Asp Lys Gly Phe Tyr Leu Asp Gly Ser Asp Thr Ile Val Cys Asp
 260 265 270
 Ser Asn Ser Thr Trp Asp Pro Pro Val Pro Lys Cys Leu Lys Val Ser
 275 280 285
 Thr Ser Ser Thr Thr Lys Ser Pro Ala Ser Ser Ala Ser Gly Pro Arg
 290 295 300
 Pro Thr Tyr Lys Pro Pro Val Ser Asn Tyr Pro Gly Tyr Pro Lys Pro
 305 310 315 320
 Glu Glu Gly Ile Leu Asp Ser Leu Asp Val Trp Val Ile Ala Val Ile
 325 330 335
 Val Ile Ala Ile Val Val Gly Val Ala Val Ile Cys Val Val Pro Tyr
 340 345 350
 Arg Tyr Leu Gln Arg Arg Lys Lys Lys Gly Thr Tyr Leu Thr Asp Glu
 355 360 365
 Thr His Arg Glu Val Lys Phe Thr Ser Leu
 370 375

<210> 17

<211>440

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 17

Met Glu Val Ser Ser Arg Ser Ser Glu Pro Leu Asp Pro Val Trp Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Ala Phe Gly Arg Gly Gly Val Lys Leu Glu Val Leu Leu Leu
 20 25 30
 Phe Leu Leu Pro Phe Thr Leu Gly His Cys Pro Ala Pro Ser Gln Leu
 35 40 45
 Pro Ser Ala Lys Pro Ile Asn Leu Thr Asp Glu Ser Met Phe Pro Ile
 50 55 60

Gly Thr Tyr Leu Leu Tyr Glu Cys Leu Pro Gly Tyr Ile Lys Arg Gln
 65 70 75 80
 Phe Ser Ile Thr Cys Lys Gln Asp Ser Thr Trp Thr Ser Ala Glu Asp
 85 90 95
 Lys Cys Ile Arg Lys Gln Cys Lys Thr Pro Ser Asp Pro Glu Asn Gly
 100 105 110
 Leu Val His Val His Thr Gly Ile Gln Phe Gly Ser Arg Ile Asn Tyr
 115 120 125
 Thr Cys Asn Gln Gly Tyr Arg Leu Ile Gly Ser Ser Ser Ala Val Cys
 130 135 140
 Val Ile Thr Asp Gln Ser Val Asp Trp Asp Thr Glu Ala Pro Ile Cys
 145 150 155 160
 Glu Trp Ile Pro Cys Glu Ile Pro Pro Gly Ile Pro Asn Gly Asp Phe
 165 170 175
 Phe Ser Ser Thr Arg Glu Asp Phe His Tyr Gly Met Val Val Thr Tyr
 180 185 190
 Arg Cys Asn Thr Asp Ala Arg Gly Lys Ala Leu Phe Asn Leu Val Gly
 195 200 205
 Glu Pro Ser Leu Tyr Cys Thr Ser Asn Asp Gly Glu Ile Gly Val Trp
 210 215 220
 Ser Gly Pro Pro Pro Gln Cys Ile Glu Leu Asn Lys Cys Thr Pro Pro
 225 230 235 240
 Pro Tyr Val Glu Asn Ala Val Met Leu Ser Glu Asn Arg Ser Leu Phe
 245 250 255
 Ser Leu Arg Asp Ile Val Glu Phe Arg Cys His Pro Gly Phe Ile Met
 260 265 270
 Lys Gly Ala Ser Ser Val His Cys Gln Ser Leu Asn Lys Trp Glu Pro
 275 280 285
 Glu Leu Pro Ser Cys Phe Lys Gly Val Ile Cys Arg Leu Pro Gln Glu
 290 295 300
 Met Ser Gly Phe Gln Lys Gly Leu Gly Met Lys Lys Glu Tyr Tyr Tyr
 305 310 315 320
 Gly Glu Asn Val Thr Leu Glu Cys Glu Asp Gly Tyr Thr Leu Glu Gly
 325 330 335
 Ser Ser Gln Ser Gln Cys Gln Ser Asp Gly Ser Trp Asn Pro Leu Leu
 340 345 350
 Ala Lys Cys Val Ser Arg Ser Ile Ser Gly Leu Ile Val Gly Ile Phe
 355 360 365
 Ile Gly Ile Ile Val Phe Ile Leu Val Ile Ile Val Phe Ile Trp Met
 370 375 380
 Ile Leu Lys Tyr Lys Lys Arg Asn Thr Thr Asp Glu Lys Tyr Lys Glu
 385 390 395 400
 Val Gly Ile His Leu Asn Tyr Lys Glu Asp Ser Cys Val Arg Leu Gln
 405 410 415
 Ser Leu Leu Thr Ser Gln Glu Asn Ser Ser Thr Thr Ser Pro Ala Arg
 420 425 430
 Asn Ser Leu Thr Gln Glu Val Ser
 435 440

ES 2 392 511 T3

<210> 18

<211> 232

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 18

```

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

```

<210> 19

10 <211>454

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

15 <400> 19

ES 2 392 511 T3

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

 Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val
 145 150 155 160
 Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr
 165 170 175
 Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser
 180 185 190
 Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln
 195 200 205
 Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg
 210 215 220
 Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser
 225 230 235 240
 Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val
 245 250 255
 Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr
 260 265 270
 Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu
 275 280 285
 Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys
 290 295 300
 Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser
 305 310 315 320
 Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro
 325 330 335
 Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys
 340 345 350
 Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln
 355 360 365
 Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met
 370 375 380
 Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr
 385 390 395 400
 Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val
 405 410 415
 Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys
 420 425 430
 Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp
 435 440 445
 Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
 450

ES 2 392 511 T3

<210> 20

<211>1530

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 20

```

atggggcgccg cgggcctgct cgggggttttc ttggctctcg togcaccggg ggtcctcggg 60
atctcttctg gctctcctcc gcctatccta aatggccgga ttagttatta ttctaccccc 120
attgctggtg gtaccgtgat aaggtacagt tgttcaggta ccttccgcct cattggagaa 180
aaaagtctat tatgcataac taaagacaaa gtggatggaa cctgggataa acctgctcct 240
aaatgtgaat atttcaataa atattcttct tgccctgagc ccatagtacc aggaggatac 300
aaaattagag gctctacacc ctacagacat ggtgattctg tgacatttgc ctgtaaaacc 360
aacttctcca tgaacggaaa caagtctggt tgggtgcaag caaataatat gtgggggccc 420
acacgactac caacctgtgt aagtgttttc cctctcgagt gtccagcact tcctatgatc 480
cacaatggac atcacacaag tgagaatggt ggctccattg ctccaggatt gtctgtgact 540

```

```

tacagctgtg aatctgggta cttgcttgtt ggagaaaaga tcattaactg tttgtcttcg 600
ggaaaatgga gtgctgtccc ccccacatgt gaagaggcac gctgtaaate tctaggacga 660
tttcccaatg ggaaggtaaa ggagcctcca attctccggg ttggtgtaac tgcaaacttt 720
ttctgtgatg aagggtatcg actgcaagga ccaccttcta gtcgggtgtg aattgctgga 780
cagggagttg cttggaccaa aatgccagta tgtgaagaaa ttttttgccc actgcccggc 840
cagtctagag acaaaactca cacatgccc cctgcccag cacctgaact cctgggggga 900
ccgtcagctc tcctcttccc cccaaaacc aaggacaccc tcatgatctc cgggaccctc 960
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 1020
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc ogcgggagga gcagtacaac 1080
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 1140
gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagtc ccatcgagaa aaccatctcc 1200
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc cggggaggag 1260
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1320
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1380
ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1440
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1500
cagaagagcc tctcctgtc cccgggtaaa 1530

```

<210> 21

10 <211> 510

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

15 <400> 21

ES 2 392 511 T3

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

ES 2 392 511 T3

Val	Ile	Ala	Gly	Gln	Gly	Val	Ala	Trp	Thr	Lys	Met	Pro	Val	Cys	Glu
			260					265					270		
Glu	Ile	Phe	Cys	Pro	Leu	Arg	Pro	Gln	Ser	Arg	Asp	Lys	Thr	His	Thr
		275					280					285			
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		290				295					300				
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
305					310					315					320
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
				325						330					335
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
			340					345						350	
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
		355					360						365		
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
		370				375					380				
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Val	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
385					390					395					400
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
				405						410					415
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
			420					425					430		
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
		435					440					445			
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
		450				455					460				
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
465					470					475					480
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
				485						490					495
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
			500					505					510		

<210> 22

<211>233

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 22

ES 2 392 511 T3

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

Ala	Gln	Thr	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Arg	Glu	Gln	Met
	130					135					140				
Ser	Lys	Lys	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asn	Phe	Phe	Ser
145					150					155					160
Glu	Ala	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu	Glu	Gln	Asp
				165					170					175	
Tyr	Lys	Asn	Thr	Pro	Pro	Ile	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Thr	Tyr	Phe	Leu
			180					185					190		
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Asp	Ser	Trp	Leu	Gln	Gly	Glu	Ile
		195					200					205			
Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Gln
	210					215					220				
Lys	Asn	Leu	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly	Lys							
225						230									

<210> 23

<211> 4860

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 23

ES 2 392 511 T3

gctctctaca cctcatcac cctgctggt ttgogaacag acacagaaga gcaaattttg 60
gtggaggccc atggagacag tactccaaaa cagcttgaca tctttgttca tgattttcca 120
cggaagcaga aaaccttggt ccaaaccaga gtagatatga atccagcagg aggcattgctt 180
gtcactccaa ctatagagat tccagcaaaa gaagtgaagta cggactccag gcaaaatcaa 240
tatgtggttg tgcaagtaac tggctcctcaa gtgagattgg aaaaggtggt tctcctttct 300
taccagagta gctttctggt tatccagaca gataaaggca tctatacacc agggctcca 360
gtactctatc gtgttttttc tatggatcac aacacaagca agatgaacaa aactgtgatt 420
gttgagtctc agactccaga aggcattctt gtcagttcta attcagttga cctaaacttc 480
ttctggcctt acaatttacc agaccttgtc agtttgggga ctggaggat tgtggccaaa 540
tatgaacatt cccagagaa ttatactgca tattttgatg tcaggaaata tgtgttgcca 600
agctttgaag tccgtctgca accatcagag aagttttttt acattgacgg caatgaaaat 660
ttccacgtgt ctatcactgc aaggtacttg tatggagagg aagtggaagg tgtggccttt 720
gtcctctttg gagtgaaaat agatgatgct aaaaagagta ttccagactc actcacgaga 780
attccgatta ttgatggaga tgggaaagca aactaaaaa gagatacatt ccgttctcga 840
tttccaaatc tcaatgagct tgttgggcat actctgtatg catctgtaac agtcatgaca 900
gaatcaggca gtgatatggt agtgactgag caaagcggca ttcataattgt ggcatctccc 960
tatcagatcc acttcacaaa aacccccaaa tatttcaagc caggaatgcc atatgaactg 1020
acggtgtatg ttaccaaccc tgatggctca ccagctgccc atgtgccagt ggtatcagag 1080
gcctttcatt ctatgggaac cactttgagt gatgggactg ctaagctcat cctgaacata 1140
ccattgaaatg ctcaaagcct accaatcact gttagaacta accatggaga cctcccaaga 1200
gaacgccagg caacaaagtc catgacagcc atagcctacc aaaccaggg aggatctgga 1260
aactatcttc atgtagccat tacatctaca gagattaagc ccggagataa cttacctgtc 1320
aatctcaatg tgaagggcaa tgcaaatca ctgaagcaga tcaaatattt cacatactc 1380
atattgaata aaggaagat tttcaagggt ggcaggcaac ccaggagaga tgggcagaat 1440
ctggtgacca tgaatctgca tctactcca gatctcatcc ctctctccg gtttgtggct 1500
tactaccaag tgggaaacaa cgaaattgtg gctgattctg tctgggtgga tgtgaaggat 1560
acctgcatgg gaacgttgggt tgtgaaagga gacaatctaa tacaatgcc aggagctgca 1620
atgaaaatca aattggaagg ggatccaggt gctcgggttg gtcttgtggc tgtggacaaa 1680
gcagtatatg ttctcaatga taaatataag attagccaag ctaagatatg ggacacaata 1740
gaaaagagtg actttggctg tacagctggc agtggccaga ataactctgg tgtgtttgaa 1800
gatgctggac tggctctgac aaccagcact aatctcaaca ccaaacagag atcagctgca 1860
aagtgtcctc agcctgcaaa tccggagcgt cgcagttctg ttttgctgct tgacagcaac 1920
gcaagcaaag cggcagaatt tcaggatcaa gacctgcgta aatgctgtga agatgtcatg 1980
catgagaacc ccatggggta cacttgtgaa aagcgtgcaa aatacatcca ggaggagat 2040
gcttgaagg ctgccttctt tgaatgctgt cgctacatca aggggtccg agatgaaaac 2100

ES 2 392 511 T3

caacgggaga gcgagttggt tctggcaaga gatgataatg aagatgggtt catagcagat 2160
 agtgatatca tctcaaggctc tgatttcccc aagagttggg tgtggctaac aaaggacttg 2220
 accgaggagc ctaacaggtca agggatttca agcaagacaa tgtcttttta tctgagggat 2280
 tccatcacia cctgggtggg gctggctgta agctttacac ccaccaaagg gatctgtgtg 2340
 gctgaacctt atgaaataag agtcatgaaa gtcttcttca ttgatcttca aatgccatat 2400
 tcagtagtga agaatgagca ggtggagatt cgagctatc tgcacaacta cgttaacgag 2460
 gatatttatg tgcgagtggg actgttatac aaccagcct tctgcagtgc tccacaaaa 2520
 ggacaaagat accgacagca gtcccaatt aaagccctgt cctccagagc agtaccgttt 2580
 gtgatagtcc cattagagca aggattgcat gatggtgaga ttaaagcaag tgtocaggaa 2640
 gcgttgtggg cagacgggtg gaggaagaaa ctgaaagttg tacctgaagg ggtacagaaa 2700
 tccattgtga ctattgttaa actggacca agggcaaaaag gagttgggtg aacacagcta 2760
 gaagtgatca aagcccgcaa attagatgac agagtgcctg acacagaaat tgaaccaag 2820
 attatcatcc aaggtgacct tgtggctcag attattgaaa actcaattga tggagtaaa 2880
 ctcaaccatc tcattatcac tcttctggc tgtggggagc aaaatatgat ccgcatggcc 2940
 gcaccagtta ttgccacctc ctacctggag accacagagc agtggggagc tctcggcata 3000
 aatcgcagga ctgaagctgt caatcagatc gtgactgggt atgcccagca gatggtgtac 3060
 aagaaagcag atcattccta tgcagcattt acaaacctgt catctagttc ttggctaaca 3120
 gcatatgtcg taaaagtctt tgccatggct gccaaaatgg tagcaggcat tagtcatgaa 3180
 atcatttgtg gaggtgtgag gtggctgatt ctgaacaggc aacaaccaga tggagcgttc 3240
 aaagaaaatg ccctgtact ttctggaaca atgcagggag gaattcaagg tgcgaagaa 3300
 gaagtatatt taacagcttt cattctgggt gcgttggtgg aatccaaaac aatctgcaat 3360
 gactatgtca atagtctaga cagcagcatc aagaaggcca caaattattt actcaaaaag 3420
 tatgagaaac tgcaaaggcc ttacactaca gccctcacag cctatgcttt ggctgctgca 3480
 gaccaactca atgatgacag ggtactcatg gcagcatcaa caggaagggg tcatitgggaa 3540
 gaatacaatg ctcacacca caacattgaa ggcacttctt atgccttgtt ggccctgctg 3600
 aaaatgaaga aatttgatca aactgggtccc atagtcagat ggctgacaga tcagaatttt 3660
 tatgggaaaa catatggaca aaccaagca acagttatgg catttcaagc tcttgctgaa 3720
 tatgagattc agatgcctac ccataaggac ttaaacttag atattactat tgaactgcca 3780
 gatcgagaag tacctataag gtacagaatt aattatgaaa atgctctcct ggctcggaca 3840
 gtagagacca aactcaacca agacatcact gtgacagcat caggtgatgg aaaagcaaca 3900
 atgaccattt tgacattcta taacgcacag ttgcaggaga aggcaaatgt ttgcaataaa 3960
 tttcatctta atgtttctgt tgaaaacatc cacttgaatg caatggggagc caagggagcc 4020
 ctcatgctca agatctgcac aaggatctgt ggagaagttg attctacaat gacaataatt 4080
 gatatttcta tgctgactgg ttttctcctt gatgctgaag accttacaag gctttctaaa 4140
 ggagtggaca gatacatctc cagatatgaa gttgacaata atatggctca gaaagtagct 4200
 gttatcattt acttaaaaaa ggtctcccac tctgaagatg aatgcctgca ctttaagatt 4260
 ctcaagcatt ttgaagttgg cttcattcag ccaggatcag tcaaggtgta cagctactac 4320
 aatctagatg aaaaatgtac caagttctac catccagata aaggaacagg ccttctcaat 4380
 aagatatgta ttggtaacgt ttgccgatgt gcaggagaaa cctgttctct gctcaacat 4440
 caggaaagga ttgatgttcc attacaaatt gaaaaagcct gcgagacgaa tgtggattat 4500
 gtctacaaaa ccaagctgct tcgaatagaa gaacaagatg gtaatgatat ctatgtcatg 4560
 gatgttttag aagttattaa acaaggctact gacgaaaatc cacgagcaaa gaccaccag 4620
 tacataagtc aaaggaaatg ccaggaggct ctgaatctga aggtgaatga tgattatctg 4680
 atctggggtt ccaggagtga cctggtgccc acgaaagata aaatttctca catcattaca 4740
 aagaacacat ggattgagag atggccacat gaagacgaat gtcaggaaga agaattccaa 4800
 aagttgtgtg atgactttgc tcagtttagc tacacattga ctgagtttgg ctgccctact 4860

<210> 24

<211>1620

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 24

Ala Leu Tyr Thr Leu Ile Thr Pro Ala Val Leu Arg Thr Asp Thr Glu
 1 5 10 15

ES 2 392 511 T3

Glu Gln Ile Leu Val Glu Ala His Gly Asp Ser Thr Pro Lys Gln Leu
 20 25 30
 Asp Ile Phe Val His Asp Phe Pro Arg Lys Gln Lys Thr Leu Phe Gln
 35 40 45
 Thr Arg Val Asp Met Asn Pro Ala Gly Gly Met Leu Val Thr Pro Thr
 50 55 60
 Ile Glu Ile Pro Ala Lys Glu Val Ser Thr Asp Ser Arg Gln Asn Gln
 65 70 75 80
 Tyr Val Val Val Gln Val Thr Gly Pro Gln Val Arg Leu Glu Lys Val
 85 90 95
 Val Leu Leu Ser Tyr Gln Ser Ser Phe Leu Phe Ile Gln Thr Asp Lys
 100 105 110
 Gly Ile Tyr Thr Pro Gly Ser Pro Val Leu Tyr Arg Val Phe Ser Met
 115 120 125
 Asp His Asn Thr Ser Lys Met Asn Lys Thr Val Ile Val Glu Phe Gln
 130 135 140
 Thr Pro Glu Gly Ile Leu Val Ser Ser Asn Ser Val Asp Leu Asn Phe
 145 150 155 160
 Phe Trp Pro Tyr Asn Leu Pro Asp Leu Val Ser Leu Gly Thr Trp Arg
 165 170 175
 Ile Val Ala Lys Tyr Glu His Ser Pro Glu Asn Tyr Thr Ala Tyr Phe
 180 185 190
 Asp Val Arg Lys Tyr Val Leu Pro Ser Phe Glu Val Arg Leu Gln Pro
 195 200 205
 Ser Glu Lys Phe Phe Tyr Ile Asp Gly Asn Glu Asn Phe His Val Ser
 210 215 220
 Ile Thr Ala Arg Tyr Leu Tyr Gly Glu Glu Val Glu Gly Val Ala Phe
 225 230 235 240
 Val Leu Phe Gly Val Lys Ile Asp Asp Ala Lys Lys Ser Ile Pro Asp
 245 250 255
 Ser Leu Thr Arg Ile Pro Ile Ile Asp Gly Asp Gly Lys Ala Thr Leu
 260 265 270
 Lys Arg Asp Thr Phe Arg Ser Arg Phe Pro Asn Leu Asn Glu Leu Val
 275 280 285
 Gly His Thr Leu Tyr Ala Ser Val Thr Val Met Thr Glu Ser Gly Ser
 290 295 300
 Asp Met Val Val Thr Glu Gln Ser Gly Ile His Ile Val Ala Ser Pro
 305 310 315 320
 Tyr Gln Ile His Phe Thr Lys Thr Pro Lys Tyr Phe Lys Pro Gly Met
 325 330 335
 Pro Tyr Glu Leu Thr Val Tyr Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ala
 340 345 350
 Ala His Val Pro Val Val Ser Glu Ala Phe His Ser Met Gly Thr Thr
 355 360 365
 Leu Ser Asp Gly Thr Ala Lys Leu Ile Leu Asn Ile Pro Leu Asn Ala
 370 375 380
 Gln Ser Leu Pro Ile Thr Val Arg Thr Asn His Gly Asp Leu Pro Arg
 385 390 395 400
 Glu Arg Gln Ala Thr Lys Ser Met Thr Ala Ile Ala Tyr Gln Thr Gln
 405 410 415
 Gly Gly Ser Gly Asn Tyr Leu His Val Ala Ile Thr Ser Thr Glu Ile
 420 425 430
 Lys Pro Gly Asp Asn Leu Pro Val Asn Phe Asn Val Lys Gly Asn Ala
 435 440 445
 Asn Ser Leu Lys Gln Ile Lys Tyr Phe Thr Tyr Leu Ile Leu Asn Lys
 450 455 460
 Gly Lys Ile Phe Lys Val Gly Arg Gln Pro Arg Arg Asp Gly Gln Asn
 465 470 475 480
 Leu Val Thr Met Asn Leu His Ile Thr Pro Asp Leu Ile Pro Ser Phe
 485 490 495

ES 2 392 511 T3

Ile Arg Met Ala Ala Pro Val Ile Ala Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Thr
980 985 990
Glu Gln Trp Glu Thr Leu Gly Ile Asn Arg Arg Thr Glu Ala Val Asn
995 1000 1005
Gln Ile Val Thr Gly Tyr Ala Gln Gln Met Val Tyr Lys Lys Ala Asp
1010 1015 1020
His Ser Tyr Ala Ala Phe Thr Asn Arg Ala Ser Ser Ser Trp Leu Thr
1025 1030 1035 1040
Ala Tyr Val Val Lys Val Phe Ala Met Ala Ala Lys Met Val Ala Gly
1045 1050 1055
Ile Ser His Glu Ile Ile Cys Gly Gly Val Arg Trp Leu Ile Leu Asn
1060 1065 1070
Arg Gln Gln Pro Asp Gly Ala Phe Lys Glu Asn Ala Pro Val Leu Ser
1075 1080 1085
Gly Thr Met Gln Gly Gly Ile Gln Gly Ala Glu Glu Val Tyr Leu
1090 1095 1100
Thr Ala Phe Ile Leu Val Ala Leu Leu Glu Ser Lys Thr Ile Cys Asn
1105 1110 1115 1120
Asp Tyr Val Asn Ser Leu Asp Ser Ser Ile Lys Lys Ala Thr Asn Tyr
1125 1130 1135
Leu Leu Lys Lys Tyr Glu Lys Leu Gln Arg Pro Tyr Thr Thr Ala Leu
1140 1145 1150
Thr Ala Tyr Ala Leu Ala Ala Ala Asp Gln Leu Asn Asp Asp Arg Val
1155 1160 1165
Leu Met Ala Ala Ser Thr Gly Arg Asp His Trp Glu Glu Tyr Asn Ala
1170 1175 1180
His Thr His Asn Ile Glu Gly Thr Ser Tyr Ala Leu Leu Ala Leu Leu
1185 1190 1195 1200
Lys Met Lys Lys Phe Asp Gln Thr Gly Pro Ile Val Arg Trp Leu Thr
1205 1210 1215
Asp Gln Asn Phe Tyr Gly Glu Thr Tyr Gly Gln Thr Gln Ala Thr Val
1220 1225 1230
Met Ala Phe Gln Ala Leu Ala Glu Tyr Glu Ile Gln Met Pro Thr His
1235 1240 1245
Lys Asp Leu Asn Leu Asp Ile Thr Ile Glu Leu Pro Asp Arg Glu Val
1250 1255 1260
Pro Ile Arg Tyr Arg Ile Asn Tyr Glu Asn Ala Leu Leu Ala Arg Thr
1265 1270 1275 1280
Val Glu Thr Lys Leu Asn Gln Asp Ile Thr Val Thr Ala Ser Gly Asp
1285 1290 1295
Gly Lys Ala Thr Met Thr Ile Leu Thr Phe Tyr Asn Ala Gln Leu Gln
1300 1305 1310
Glu Lys Ala Asn Val Cys Asn Lys Phe His Leu Asn Val Ser Val Glu
1315 1320 1325
Asn Ile His Leu Asn Ala Met Gly Ala Lys Gly Ala Leu Met Leu Lys
1330 1335 1340
Ile Cys Thr Arg Tyr Leu Gly Glu Val Asp Ser Thr Met Thr Ile Ile
1345 1350 1355 1360
Asp Ile Ser Met Leu Thr Gly Phe Leu Pro Asp Ala Glu Asp Leu Thr
1365 1370 1375
Arg Leu Ser Lys Gly Val Asp Arg Tyr Ile Ser Arg Tyr Glu Val Asp
1380 1385 1390
Asn Asn Met Ala Gln Lys Val Ala Val Ile Ile Tyr Leu Asn Lys Val
1395 1400 1405
Ser His Ser Glu Asp Glu Cys Leu His Phe Lys Ile Leu Lys His Phe
1410 1415 1420
Glu Val Gly Phe Ile Gln Pro Gly Ser Val Lys Val Tyr Ser Tyr Tyr
1425 1430 1435 1440
Asn Leu Asp Glu Lys Cys Thr Lys Phe Tyr His Pro Asp Lys Gly Thr
1445 1450 1455

ES 2 392 511 T3

Gly Leu Leu Asn Lys Ile Cys Ile Gly Asn Val Cys Arg Cys Ala Gly
 1460 1465 1470
 Glu Thr Cys Ser Ser Leu Asn His Gln Glu Arg Ile Asp Val Pro Leu
 1475 1480 1485
 Gln Ile Glu Lys Ala Cys Glu Thr Asn Val Asp Tyr Val Tyr Lys Thr
 1490 1495 1500
 Lys Leu Leu Arg Ile Glu Glu Gln Asp Gly Asn Asp Ile Tyr Val Met
 1505 1510 1515 1520
 Asp Val Leu Glu Val Ile Lys Gln Gly Thr Asp Glu Asn Pro Arg Ala
 1525 1530 1535
 Lys Thr His Gln Tyr Ile Ser Gln Arg Lys Cys Gln Glu Ala Leu Asn
 1540 1545 1550
 Leu Lys Val Asn Asp Asp Tyr Leu Ile Trp Gly Ser Arg Ser Asp Leu
 1555 1560 1565
 Leu Pro Thr Lys Asp Lys Ile Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Asn Thr Trp
 1570 1575 1580
 Ile Glu Arg Trp Pro His Glu Asp Glu Cys Gln Glu Glu Glu Phe Gln
 1585 1590 1595 1600
 Lys Leu Cys Asp Asp Phe Ala Gln Phe Ser Tyr Thr Leu Thr Glu Phe
 1605 1610 1615
 Gly Cys Pro Thr
 1620

<210> 25

<211> 3039

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 25

ES 2 392 511 T3

atttcttgtg gctctcctec gcctatecta aatggccgga ttagttatta ttctaccccc 60
 attgctgttg gtaccgtgat aaggtagagt tggtcaggta ccttccgcct cattggagaa 120
 aaaagtctat tatgcataac taaagacaaa gtggatggaa cctgggataa acctgctcct 180
 aaatgtgaat atttcaataa atattcttct tgcoctgagc ccatagtacc aggaggatac 240
 aaaattagag gctctacacc ctacagacat ggtgattctg tgacatttgc ctgtaaaacc 300
 aacttctcca tgaacggaaa caagtctgtt tgggtgtcaag caaataatat gtggggggccg 360
 acacgactac caacctgtgt aagtgttttc cctctcgagt gtccagcact tcctatgac 420
 cacaatggac atcacacaag tgagaatggt ggctccattg ctccaggatt gtctgtgact 480
 tacagctgtg aatctgggta cttgcttgtt ggagaaaaga tcattaactg tttgtcttcg 540
 ggaaaatgga gtgctgtccc cccacatgt gaagaggcac gctgtaaatc tctaggacga 600
 tttcccaatg ggaaggtaaa ggagcctcca attctccggg ttggtgtaac tgcaaaactt 660
 ttctgtgatg aagggtatcg actgcaaggc ccaccttcta gtcggtgtgt aattgctgga 720
 cagggagtgt cttggaccaa aatgccagta tgtgaagaaa ttttttgccc atcacctccc 780
 cctattctca atggaagaca tataggcaac tcaactagcaa atgtctcata tgggaagcata 840
 gtcacttaca cttgtgaccc ggaccagag gaaggagtga acttcatcct tattggagag 900
 agcactctcc gttgtacagt tgatagttag aagactggga cctggagtgg ccctgcccc 960
 cgctgtgaac tttctacttc tgcggttcag tgtccacatc cccagatcct aagaggccga 1020
 atggtatctg ggcagaaaaga tcgatatacc tataacgaca ctgtgatatt tgcttgcattg 1080
 tttggcttca ccttgaaggg cagcaagcaa atccgatgca atgcccagg cacatgggag 1140
 ccatctgcac cagtctgtga aaaggaatgc caggccccct ctaacatcct caatgggcaa 1200
 aaggaagata gacacatggt ccgctttgac cctggaacat ctataaaata tagctgtaac 1260
 cctggctatg tgctggtggg agaagaatcc atacagtgta cctctgaggg ggtgtggaca 1320
 cccctgtac cccaatgcaa agtggcagcg tgtgaagcta caggaaggca actcttgaca 1380
 aaaccccagc accaatttgt tagaccagat gtcaactctt cttgtggtga agggatacaag 1440
 ttaagtggga gtgtttatca ggagtgtcaa ggcacaattc cttggtttat ggagattcgt 1500
 ctttgtaaag aatcacctg cccaccacc cctgttatct acaatggggc acacaccggg 1560
 agttccttag aagattttcc atatggaacc acggtcactt acacatgtaa ccctggggcca 1620

gaaagaggag tggaaatcag cctcattgga gagagcacca tccgttgtac aagcaatgat 1680
 caagaaagag gcacctggag tggcoctgct cccctatgta aactttccct ccttgcctgtc 1740
 cagtgtcac atgtccatat tgcaaatgga tacaagatat ctggcaagga agccccatat 1800
 ttctacaatg acactgtgac attcaagtgt tatagtggat ttactttgaa gggcagtagt 1860
 cagattcgtt gcaaagctga taacacctgg gatcctgaaa taccagtttg tgaaaaagaa 1920
 acatgccagc atgtgagaca gagtcttcaa gaacttccag ctggttcacg tgtggagcta 1980
 gttaatacgt cctgccaaga tgggtaccag ttgactggac atgcttatca gatgtgtcaa 2040
 gatgctgaaa atggaatttg gttcaaaaag attccacttt gtaaagtatt tcaactgtcac 2100
 cctccaccag tgattgtcaa tgggaagcac acagggatga tggcagaaaa ctttctatat 2160
 ggaaatgaag tctcttatga atgtgaccaa ggattctatc tcctgggaga gaaaaaattg 2220
 cagtgcagaa gtgattctaa aggacatgga tcttggagcg ggcttcccc acagtgctta 2280
 cgatctcctc ctgtgactcg ctgcocta at ccagaagtca aacatgggta caagctcaat 2340
 aaaacacatt ctgcatatc ccacaatgac atagtgtatg ttgactgcaa tcctggcttc 2400
 atcatgaatg gtagtcgctg gattaggtgt catactgata acacatgggt gccaggtgtg 2460
 ccaacttgta tgaaaaaagc cttcataggg tgtccacctc cgctaagac ccctaacggg 2520
 aaccatactg gtggaacat agctcgattt tctcctggaa tgtcaatcct gtacagctgt 2580
 gaccaagct acctgctggg gggagaggca ctcctcttt gcacacatga ggaacactgg 2640
 agccaacctg cccctcattg taaagaggta aactgtagct caccagcaga tatggatgga 2700
 atccagaaag ggctggaacc aaggaaaatg tatcagtatg gagctgttgt aactctggag 2760
 tgtgaagatg ggtatatgct ggaaggcagt cccagagacc agtgccaatc ggatcaccaa 2820
 tggaaacctc ccctggcggt ttgcagatcc cgttccactg ctcctgtcct ttgtggatt 2880
 gctgcaggtt tgatacttct taccttcttg attgtcatta ccttatacgt gatatacaaaa 2940
 cacagagaac gcaattatta tacagataca agccagaaag aagcttttca tttagaagca 3000
 cgagaagtat attctgttga tccatacaac ccagccagc . . . 3039

<210> 26

<211>1033

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 26

```

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

```

ES 2 392 511 T3

Thr Cys Glu Glu Ala Arg Cys Lys Ser Leu Gly Arg Phe Pro Asn Gly
 210 215 220
 Lys Val Lys Glu Pro Pro Ile Leu Arg Val Gly Val Thr Ala Asn Phe
 225 230 235 240
 Phe Cys Asp Glu Gly Tyr Arg Leu Gln Gly Pro Pro Ser Ser Arg Cys
 245 250 255
 Val Ile Ala Gly Gln Gly Val Ala Trp Thr Lys Met Pro Val Cys Glu
 260 265 270
 Glu Ile Phe Cys Pro Ser Pro Pro Pro Ile Leu Asn Gly Arg His Ile
 275 280 285
 Gly Asn Ser Leu Ala Asn Val Ser Tyr Gly Ser Ile Val Thr Tyr Thr
 290 295 300
 Cys Asp Pro Asp Pro Glu Glu Gly Val Asn Phe Ile Leu Ile Gly Glu
 305 310 315 320
 Ser Thr Leu Arg Cys Thr Val Asp Ser Gln Lys Thr Gly Thr Trp Ser
 325 330 335
 Gly Pro Ala Pro Arg Cys Glu Leu Ser Thr Ser Ala Val Gln Cys Pro
 340 345 350
 His Pro Gln Ile Leu Arg Gly Arg Met Val Ser Gly Gln Lys Asp Arg
 355 360 365
 Tyr Thr Tyr Asn Asp Thr Val Ile Phe Ala Cys Met Phe Gly Phe Thr
 370 375 380
 Leu Lys Gly Ser Lys Gln Ile Arg Cys Asn Ala Gln Gly Thr Trp Glu
 385 390 395 400
 Pro Ser Ala Pro Val Cys Glu Lys Glu Cys Gln Ala Pro Pro Asn Ile
 405 410 415
 Leu Asn Gly Gln Lys Glu Asp Arg His Met Val Arg Phe Asp Pro Gly
 420 425 430
 Thr Ser Ile Lys Tyr Ser Cys Asn Pro Gly Tyr Val Leu Val Gly Glu
 435 440 445
 Glu Ser Ile Gln Cys Thr Ser Glu Gly Val Trp Thr Pro Pro Val Pro
 450 455 460
 Gln Cys Lys Val Ala Ala Cys Glu Ala Thr Gly Arg Gln Leu Leu Thr
 465 470 475 480
 Lys Pro Gln His Gln Phe Val Arg Pro Asp Val Asn Ser Ser Cys Gly
 485 490 495
 Glu Gly Tyr Lys Leu Ser Gly Ser Val Tyr Gln Glu Cys Gln Gly Thr
 500 505 510
 Ile Pro Trp Phe Met Glu Ile Arg Leu Cys Lys Glu Ile Thr Cys Pro
 515 520 525
 Pro Pro Pro Val Ile Tyr Asn Gly Ala His Thr Gly Ser Ser Leu Glu
 530 535 540
 Asp Phe Pro Tyr Gly Thr Thr Val Thr Tyr Thr Cys Asn Pro Gly Pro
 545 550 555 560
 Glu Arg Gly Val Glu Phe Ser Leu Ile Gly Glu Ser Thr Ile Arg Cys
 565 570 575
 Thr Ser Asn Asp Gln Glu Arg Gly Thr Trp Ser Gly Pro Ala Pro Leu
 580 585 590
 Cys Lys Leu Ser Leu Leu Ala Val Gln Cys Ser His Val His Ile Ala
 595 600 605
 Asn Gly Tyr Lys Ile Ser Gly Lys Glu Ala Pro Tyr Phe Tyr Asn Asp
 610 615 620
 Thr Val Thr Phe Lys Cys Tyr Ser Gly Phe Thr Leu Lys Gly Ser Ser
 625 630 635 640
 Gln Ile Arg Cys Lys Ala Asp Asn Thr Trp Asp Pro Glu Ile Pro Val
 645 650 655
 Cys Glu Lys Glu Thr Cys Gln His Val Arg Gln Ser Leu Gln Glu Leu
 660 665 670
 Pro Ala Gly Ser Arg Val Glu Leu Val Asn Thr Ser Cys Gln Asp Gly
 675 680 685

Tyr Gln Leu Thr Gly His Ala Tyr Gln Met Cys Gln Asp Ala Glu Asn
 690 695 700
 Gly Ile Trp Phe Lys Lys Ile Pro Leu Cys Lys Val Ile His Cys His
 705 710 715 720
 Pro Pro Pro Val Ile Val Asn Gly Lys His Thr Gly Met Met Ala Glu
 725 730 735
 Asn Phe Leu Tyr Gly Asn Glu Val Ser Tyr Glu Cys Asp Gln Gly Phe
 740 745 750
 Tyr Leu Leu Gly Glu Lys Lys Leu Gln Cys Arg Ser Asp Ser Lys Gly
 755 760 765
 His Gly Ser Trp Ser Gly Pro Ser Pro Gln Cys Leu Arg Ser Pro Pro
 770 775 780
 Val Thr Arg Cys Pro Asn Pro Glu Val Lys His Gly Tyr Lys Leu Asn
 785 790 795 800
 Lys Thr His Ser Ala Tyr Ser His Asn Asp Ile Val Tyr Val Asp Cys
 805 810 815
 Asn Pro Gly Phe Ile Met Asn Gly Ser Arg Val Ile Arg Cys His Thr
 820 825 830
 Asp Asn Thr Trp Val Pro Gly Val Pro Thr Cys Met Lys Lys Ala Phe
 835 840 845
 Ile Gly Cys Pro Pro Pro Pro Lys Thr Pro Asn Gly Asn His Thr Gly
 850 855 860
 Gly Asn Ile Ala Arg Phe Ser Pro Gly Met Ser Ile Leu Tyr Ser Cys
 865 870 875 880
 Asp Gln Gly Tyr Leu Leu Val Gly Glu Ala Leu Leu Leu Cys Thr His
 885 890 895
 Glu Gly Thr Trp Ser Gln Pro Ala Pro His Cys Lys Glu Val Asn Cys
 900 905 910
 Ser Ser Pro Ala Asp Met Asp Gly Ile Gln Lys Gly Leu Glu Pro Arg
 915 920 925
 Lys Met Tyr Gln Tyr Gly Ala Val Val Thr Leu Glu Cys Glu Asp Gly
 930 935 940
 Tyr Met Leu Glu Gly Ser Pro Gln Ser Gln Cys Gln Ser Asp His Gln
 945 950 955 960
 Trp Asn Pro Pro Leu Ala Val Cys Arg Ser Arg Ser Leu Ala Pro Val
 965 970 975
 Leu Cys Gly Ile Ala Ala Gly Leu Ile Leu Leu Thr Phe Leu Ile Val
 980 985 990
 Ile Thr Leu Tyr Val Ile Ser Lys His Arg Glu Arg Asn Tyr Tyr Thr
 995 1000 1005
 Asp Thr Ser Gln Lys Glu Ala Phe His Leu Glu Ala Arg Glu Val Tyr
 1010 1015 1020
 Ser Val Asp Pro Tyr Asn Pro Ala Ser
 1025 1030

<210> 27

<211> 3042

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 27

ES 2 392 511 T3

attctctgtg accctcctcc tgaagtcaaa aatgctogga aacctatta ttctcttccc 60
 atagttcctg gaactgttct gaggtacact tgttcacct gctaccgct cattggagaa 120
 aaggctatct tttgtataag tgaaaatcaa gtgcatgcca cctgggataa agctcctcct 180
 atatgtgaat ctgtgaataa aaccatttct tgctcagatc ccatagtacc agggggattc 240
 atgaataaag gatctaaggc accattcaga catggtgatt ctgtgacatt tacctgtaaa 300

 gccaacttca ccatgaaagg aagcaaaact gtctgggtgcc aggcaaatga aatgtgggga 360
 ccaacagctc tgccagtctg tgagagtgat ttccctctgg agtgcccatc acttccaacg 420
 attcataatg gacaccacac aggacagcat gttgaccagt ttgttgctgg gttgtctgtg 480
 acatacagtt gtgaacctgg ctatttgctc actggaaaaa agacaattaa gtgcttatct 540
 tcaggagact gggatgggtg catcccgaca tgcaaagagg cccagtgtga acatccagga 600
 aagttccca atgggcaggt aaaggaacct ctgagccttc aggttggcac aactgtgtac 660
 ttctcctgta atgaagggtg ccaattaca ggacaacct ctagtctgtg tgaattgtt 720
 gaacgaaaag ccatctggac taagaagcca gtatgtaag aaattctctg cccaccacct 780
 ccacctgtc gtaatggaag tcatacaggc agcttttcag aaaatgtacc atatggaagc 840
 acagtacct acactgtga cccaagccca gagaaaggcg tgagcttcac tcttattgga 900
 gagaagacta tcaattgtac tactggtagt cagaagactg ggatctggag tggccctgct 960
 ccatattgtg tactttcaac ttctgcagtt ctgtgtttac aaccgaagat caaaagaggg 1020
 caaatattat ctattttgaa agatagttat tcatataatg aactgtggc attttcttgt 1080
 gaacctggct tcacctgaa gggcaacagg agcattcgat gcaatgctca tggcacatgg 1140
 gagccaccgg taccagtgtg tgaaaaagga tgtcaggctc ctctaaaat tatcaatggg 1200
 caaaaagaag atagttactt gctcaacttt gacctggta catccataag atatagctgt 1260
 gacctggct atttactggt gggagaggac actatacatt gcaccctga ggggaagtgg 1320
 acaccatta ctcccagtg cacagttgca gagtgtgaag cagtaggacc acatctctt 1380
 aagaggcctc agaatcagtt tattaggaca gctgttaatt cttcttgtga tgaagggttc 1440
 cagttaagtg agagtgttca tcaactgtgt caaggtacaa ttccttgggt tatagaaatc 1500
 cgtctttgta aagaaatcac ctgcccacca cctcctgtta tacacaacgg gacacataca 1560
 tggagttcct cagaagatgt cccatatgga actgtgtgca catacatgtg ctatcctggg 1620
 ccagaggaag gcgtaaaatt caaactcatc ggggagcaaa ccatccactg tacaagtgac 1680
 agcagaggaa gaggctcctg gtagtgcct gctcctctct gtaaaactttc cctcccagct 1740
 gtccagtgca cagacgttca tgttgaaaa ggagtcaagc tcaactgaaa taaagcccca 1800
 tatttctaca atgatagtgt gatgttcaag tgtgatgat gatataatct gagggaagc 1860
 agtcagatcc ggtgtaaac caataatacc tggatcctg aaaaaccct ttgtaaaaa 1920
 gaaggatgtg agcctatgag agtacatggc tttccagatg attcacatat aaaactagt 1980
 aaaagaacct gtcaaaatgg gtaccagtgt actggatata cttatgagaa gtgtcaaaat 2040
 gctgagaatg ggacttgggt taaaaagatt gaagtttga cagttattct ctgtcaacct 2100
 ccaccaaaaa ttgcaaatgg tggtcacaca ggcagatgg caaagcactt cctatatgga 2160
 aatgaagttt cttatgaatg tgatgaaggg ttctatcttt tgggagagaa aagtttgag 2220
 tgcgtaaatg attctaaagg tcatggctct tggagtggac ctccaccaca atgcttaca 2280
 tcttctcctc taactcattg cccgatcca gaagtcaaac atggttaca actcaataaa 2340
 actcattctg cttttctca taatgacata gtacattttg tctgcaatca aggttctatc 2400
 atgaacggca gccacttgat aaggtgtcat actaataaca catggttacc aggtgtacca 2460
 acttgatca gaaaggcttc tttaggggtg cagtctccat ccacaatccc caatgggaat 2520
 catactgggtg ggagtatagc tcatgttccc cctggaatgt cagtcatgta cagttgtctac 2580
 caaggcttcc ttatggctgg agaggcacgt cttatctgta ctcatgaggg tacctggagt 2640
 caacctcccc ctttttgcaa agaggtaaac tbtagcttcc ctgaagatac aaatggaatc 2700
 cagaagggat ttcaacctgg gaaaacctat cgatttgggg ctactgtgac tctggaatgt 2760
 gaggatgggt ataccttggg gggaggtccc cagagccagt gccaggatga cagccaatgg 2820
 aacctcctt tggctctttg caaataccgt aggtggtcaa ctattcctct tatttgtggt 2880
 atttctgtgg gctcagcact tatcattttg atgagtgtcg gcttctgtat gatattaaaa 2940
 cacagagaaa gcaattatta tacaaagaca agaccaaaag aaggagctct tcatttagaa 3000
 acacgagaag tatattctat tgatccatat aaccagcaa gc 3042

- <210> 28
- <211> 1014
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética
- <400> 28

5

Ile	Ser	Cys	Asp	Pro	Pro	Pro	Glu	Val	Lys	Asn	Ala	Arg	Lys	Pro	Tyr
1				5					10					15	
Tyr	Ser	Leu	Pro	Ile	Val	Pro	Gly	Thr	Val	Leu	Arg	Tyr	Thr	Cys	Ser
			20					25					30		
Pro	Ser	Tyr	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Ala	Ile	Phe	Cys	Ile	Ser	Glu
		35					40					45			
Asn	Gln	Val	His	Ala	Thr	Trp	Asp	Lys	Ala	Pro	Pro	Ile	Cys	Glu	Ser
50						55					60				
Val	Asn	Lys	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Asp	Pro	Ile	Val	Pro	Gly	Gly	Phe
65					70					75					80
Met	Asn	Lys	Gly	Ser	Lys	Ala	Pro	Phe	Arg	His	Gly	Asp	Ser	Val	Thr
				85					90					95	
Phe	Thr	Cys	Lys	Ala	Asn	Phe	Thr	Met	Lys	Gly	Ser	Lys	Thr	Val	Trp
			100					105					110		
Cys	Gln	Ala	Asn	Glu	Met	Trp	Gly	Pro	Thr	Ala	Leu	Pro	Val	Cys	Glu
		115					120					125			
Ser	Asp	Phe	Pro	Leu	Glu	Cys	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Ile	His	Asn	Gly
130						135					140				
His	His	Thr	Gly	Gln	His	Val	Asp	Gln	Phe	Val	Ala	Gly	Leu	Ser	Val
145					150					155					160
Thr	Tyr	Ser	Cys	Glu	Pro	Gly	Tyr	Leu	Leu	Thr	Gly	Lys	Lys	Thr	Ile
				165					170					175	
Lys	Cys	Leu	Ser	Ser	Gly	Asp	Trp	Asp	Gly	Val	Ile	Pro	Thr	Cys	Lys
			180					185						190	
Glu	Ala	Gln	Cys	Glu	His	Pro	Gly	Lys	Phe	Pro	Asn	Gly	Gln	Val	Lys
		195					200					205			
Glu	Pro	Leu	Ser	Leu	Gln	Val	Gly	Thr	Thr	Val	Tyr	Phe	Ser	Cys	Asn
		210				215					220				
Glu	Gly	Tyr	Gln	Leu	Gln	Gly	Gln	Pro	Ser	Ser	Gln	Cys	Val	Ile	Val
225					230					235					240
Glu	Gln	Lys	Ala	Ile	Trp	Thr	Lys	Lys	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Ile	Leu
				245					250					255	
Cys	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Val	Arg	Asn	Gly	Ser	His	Thr	Gly	Ser	Phe
			260					265					270		
Ser	Glu	Asn	Val	Pro	Tyr	Gly	Ser	Thr	Val	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asp	Pro
		275					280					285			
Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Val	Ser	Phe	Thr	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Thr	Ile
		290				295					300				
Asn	Cys	Thr	Thr	Gly	Ser	Gln	Lys	Thr	Gly	Ile	Trp	Ser	Gly	Pro	Ala
305					310					315					320
Pro	Tyr	Cys	Val	Leu	Ser	Thr	Ser	Ala	Val	Leu	Cys	Leu	Gln	Pro	Lys
				325				330						335	
Ile	Lys	Arg	Gly	Gln	Ile	Leu	Ser	Ile	Leu	Lys	Asp	Ser	Tyr	Ser	Tyr
			340					345					350		
Asn	Asp	Thr	Val	Ala	Phe	Ser	Cys	Glu	Pro	Gly	Phe	Thr	Leu	Lys	Gly
		355					360					365			
Asn	Arg	Ser	Ile	Arg	Cys	Asn	Ala	His	Gly	Thr	Trp	Glu	Pro	Pro	Val
		370				375					380				
Pro	Val	Cys	Glu	Lys	Gly	Cys	Gln	Ala	Pro	Pro	Lys	Ile	Ile	Asn	Gly
385					390					395					400
Gln	Lys	Glu	Asp	Ser	Tyr	Leu	Leu	Asn	Phe	Asp	Pro	Gly	Thr	Ser	Ile
				405					410					415	
Arg	Tyr	Ser	Cys	Asp	Pro	Gly	Tyr	Leu	Leu	Val	Gly	Glu	Asp	Thr	Ile
			420					425					430		
His	Cys	Thr	Pro	Glu	Gly	Lys	Trp	Thr	Pro	Ile	Thr	Pro	Gln	Cys	Thr
		435					440					445			
Val	Ala	Glu	Cys	Lys	Pro	Val	Gly	Pro	His	Leu	Phe	Lys	Arg	Pro	Gln
		450				455					460				
Asn	Gln	Phe	Ile	Arg	Thr	Ala	Val	Asn	Ser	Ser	Cys	Asp	Glu	Gly	Phe
465					470					475					480
Gln	Leu	Ser	Glu	Ser	Ala	Tyr	Gln	Leu	Cys	Gln	Gly	Thr	Ile	Pro	Trp
				485					490					495	
Phe	Ile	Glu	Ile	Arg	Leu	Cys	Lys	Glu	Ile	Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Pro
				500				505						510	

Val Ile His Asn Gly Thr His Thr Trp Ser Ser Ser Glu Asp Val Pro
 515 520 525
 Tyr Gly Thr Val Val Thr Tyr Met Cys Tyr Pro Gly Pro Glu Glu Gly
 530 535 540
 Val Lys Phe Lys Leu Ile Gly Glu Gln Thr Ile His Cys Thr Ser Asp
 545 550 555 560
 Ser Arg Gly Arg Gly Ser Trp Ser Ser Pro Ala Pro Leu Cys Lys Leu
 565 570 575
 Ser Leu Pro Ala Val Gln Cys Thr Asp Val His Val Glu Asn Gly Val
 580 585 590
 Lys Leu Thr Asp Asn Lys Ala Pro Tyr Phe Tyr Asn Asp Ser Val Met
 595 600 605
 Phe Lys Cys Asp Asp Gly Tyr Ile Leu Ser Gly Ser Ser Gln Ile Arg
 610 615 620
 Cys Lys Ala Asn Asn Thr Trp Asp Pro Glu Lys Pro Leu Cys Lys Lys
 625 630 635 640
 Glu Gly Cys Glu Pro Met Arg Val His Gly Leu Pro Asp Asp Ser His
 645 650 655
 Ile Lys Leu Val Lys Arg Thr Cys Gln Asn Gly Tyr Gln Leu Thr Gly
 660 665 670
 Tyr Thr Tyr Glu Lys Cys Gln Asn Ala Glu Asn Gly Thr Trp Phe Lys
 675 680 685
 Lys Ile Glu Val Cys Thr Val Ile Leu Cys Gln Pro Pro Pro Lys Ile
 690 695 700
 Ala Asn Gly Gly His Thr Gly Met Met Ala Lys His Phe Leu Tyr Gly
 705 710 715 720
 Asn Glu Val Ser Tyr Glu Cys Asp Glu Gly Phe Tyr Leu Leu Gly Glu
 725 730 735
 Lys Ser Leu Gln Cys Val Asn Asp Ser Lys Gly His Gly Ser Trp Ser
 740 745 750
 Gly Pro Pro Pro Gln Cys Leu Gln Ser Ser Pro Leu Thr His Cys Pro
 755 760 765
 Asp Pro Glu Val Lys His Gly Tyr Lys Leu Asn Lys Thr His Ser Ala
 770 775 780
 Phe Ser His Asn Asp Ile Val His Phe Val Cys Asn Gln Gly Phe Ile
 785 790 795 800
 Met Asn Gly Ser His Leu Ile Arg Cys His Thr Asn Asn Thr Trp Leu
 805 810 815
 Pro Gly Val Pro Thr Cys Ile Arg Lys Ala Ser Leu Gly Cys Gln Ser
 820 825 830
 Pro Ser Thr Ile Pro Asn Gly Asn His Thr Gly Gly Ser Ile Ala Arg
 835 840 845
 Phe Pro Pro Gly Met Ser Val Met Tyr Ser Cys Tyr Gln Gly Phe Leu
 850 855 860
 Met Ala Gly Glu Ala Arg Leu Ile Cys Thr His Glu Gly Thr Trp Ser
 865 870 875 880
 Gln Pro Pro Pro Phe Cys Lys Glu Val Asn Cys Ser Phe Pro Glu Asp
 885 890 895
 Thr Asn Gly Ile Gln Lys Gly Phe Gln Pro Gly Lys Thr Tyr Arg Phe
 900 905 910
 Gly Ala Thr Val Thr Leu Glu Cys Glu Asp Gly Tyr Thr Leu Glu Gly
 915 920 925
 Ser Pro Gln Ser Gln Cys Gln Asp Asp Ser Gln Trp Asn Pro Pro Leu
 930 935 940
 Ala Leu Cys Lys Tyr Arg Arg Trp Ser Thr Ile Pro Leu Ile Cys Gly
 945 950 955 960
 Ile Ser Val Gly Ser Ala Leu Ile Ile Leu Met Ser Val Gly Phe Cys
 965 970 975
 Met Ile Leu Lys His Arg Glu Ser Asn Tyr Tyr Thr Lys Thr Arg Pro
 980 985 990

ES 2 392 511 T3

Lys Glu Gly Ala Leu His Leu Glu Thr Arg Glu Val Tyr Ser Ile Asp
 995 1000 1005
 Pro Tyr Asn Pro Ala Ser
 1010

<210> 29

<211>1033

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:/nota = construcción sintética

<400> 29

Met Gly Ala Ala Gly Leu Leu Gly Val Phe Leu Ala Leu Val Ala Pro
 1 5 10 15
 Gly Val Leu Gly Ile Ser Cys Gly Ser Pro Pro Pro Val Leu Asn Gly
 20 25 30
 Arg Ile Ser Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Ala Val Gly Thr Val Ile Arg
 35 40 45
 Tyr Ser Cys Ser Gly Thr Phe Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Leu Leu
 50 55 60
 Cys Ile Thr Lys Asp Lys Val Asp Gly Thr Trp Asp Lys Pro Ala Pro
 65 70 75 80
 Lys Cys Glu Tyr Phe Asn Lys Tyr Ser Ser Cys Pro Glu Pro Ile Val
 85 90 95
 Pro Gly Gly Tyr Lys Ile Arg Gly Ser Thr Pro Tyr Arg His Gly Asp
 100 105 110
 Ser Val Thr Phe Ala Cys Lys Thr Asn Phe Ser Met Asn Gly Asn Lys
 115 120 125
 Ser Val Trp Cys Gln Ala Asn Asn Met Trp Gly Pro Thr Arg Leu Pro
 130 135 140
 Thr Cys Val Ser Val Phe Pro Leu Glu Cys Pro Ala Leu Pro Met Ile
 145 150 155 160
 His Asn Gly His His Thr Ser Glu Asn Val Gly Ser Ile Ala Pro Gly
 165 170 175
 Leu Ser Val Thr Tyr Ser Cys Glu Ser Gly Tyr Leu Leu Val Gly Glu
 180 185 190
 Lys Ile Ile Asn Cys Leu Ser Ser Gly Lys Trp Ser Ala Val Pro Pro
 195 200 205
 Thr Cys Glu Glu Ala Arg Cys Lys Ser Leu Gly Arg Phe Pro Asn Gly
 210 215 220
 Lys Val Lys Glu Pro Pro Ile Leu Arg Val Gly Val Thr Ala Asn Phe
 225 230 235 240
 Phe Cys Asp Glu Gly Tyr Arg Leu Gln Gly Pro Pro Ser Ser Arg Cys
 245 250 255
 Val Ile Ala Gly Gln Gly Val Ala Trp Thr Lys Met Pro Val Cys Glu
 260 265 270
 Glu Ile Phe Cys Pro Ser Pro Pro Pro Ile Leu Asn Gly Arg His Ile
 275 280 285
 Gly Asn Ser Leu Ala Asn Val Ser Tyr Gly Ser Ile Val Thr Tyr Thr
 290 295 300
 Cys Asp Pro Asp Pro Glu Glu Gly Val Asn Phe Ile Leu Ile Gly Glu
 305 310 315 320
 Ser Thr Leu Arg Cys Thr Val Asp Ser Gln Lys Thr Gly Thr Trp Ser
 325 330 335
 Gly Pro Ala Pro Arg Cys Glu Leu Ser Thr Ser Ala Val Gln Cys Pro
 340 345 350

ES 2 392 511 T3

His Pro Gln Ile Leu Arg Gly Arg Met Val Ser Gly Gln Lys Asp Arg
 355 360 365
 Tyr Thr Tyr Asn Asp Thr Val Ile Phe Ala Cys Met Phe Gly Phe Thr
 370 375 380
 Leu Lys Gly Ser Lys Gln Ile Arg Cys Asn Ala Gln Gly Thr Trp Glu
 385 390 395 400
 Pro Ser Ala Pro Val Cys Glu Lys Glu Cys Gln Ala Pro Pro Asn Ile
 405 410 415
 Leu Asn Gly Gln Lys Glu Asp Arg His Met Val Arg Phe Asp Pro Gly
 420 425 430
 Thr Ser Ile Lys Tyr Ser Cys Asn Pro Gly Tyr Val Leu Val Gly Glu
 435 440 445
 Glu Ser Ile Gln Cys Thr Ser Glu Gly Val Trp Thr Pro Pro Val Pro
 450 455 460
 Gln Cys Lys Val Ala Ala Cys Glu Ala Thr Gly Arg Gln Leu Leu Thr
 465 470 475 480
 Lys Pro Gln His Gln Phe Val Arg Pro Asp Val Asn Ser Ser Cys Gly
 485 490 495
 Glu Gly Tyr Lys Leu Ser Gly Ser Val Tyr Gln Glu Cys Gln Gly Thr
 500 505 510
 Ile Pro Trp Phe Met Glu Ile Arg Leu Cys Lys Glu Ile Thr Cys Pro
 515 520 525
 Pro Pro Pro Val Ile Tyr Asn Gly Ala His Thr Gly Ser Ser Leu Glu
 530 535 540
 Asp Phe Pro Tyr Gly Thr Thr Val Thr Tyr Thr Cys Asn Pro Gly Pro
 545 550 555 560
 Glu Arg Gly Val Glu Phe Ser Leu Ile Gly Glu Ser Thr Ile Arg Cys
 565 570 575
 Thr Ser Asn Asp Gln Glu Arg Gly Thr Trp Ser Gly Pro Ala Pro Leu
 580 585 590
 Cys Lys Leu Ser Leu Leu Ala Val Gln Cys Ser His Val His Ile Ala
 595 600 605
 Asn Gly Tyr Lys Ile Ser Gly Lys Glu Ala Pro Tyr Phe Tyr Asn Asp
 610 615 620
 Thr Val Thr Phe Lys Cys Tyr Ser Gly Phe Thr Leu Lys Gly Ser Ser
 625 630 635 640
 Gln Ile Arg Cys Lys Ala Asp Asn Thr Trp Asp Pro Glu Ile Pro Val
 645 650 655
 Cys Glu Lys Glu Thr Cys Gln His Val Arg Gln Ser Leu Gln Glu Leu
 660 665 670
 Pro Ala Gly Ser Arg Val Glu Leu Val Asn Thr Ser Cys Gln Asp Gly
 675 680 685
 Tyr Gln Leu Thr Gly His Ala Tyr Gln Met Cys Gln Asp Ala Glu Asn
 690 695 700
 Gly Ile Trp Phe Lys Lys Ile Pro Leu Cys Lys Val Ile His Cys His
 705 710 715 720
 Pro Pro Pro Val Ile Val Asn Gly Lys His Thr Gly Met Met Ala Glu
 725 730 735
 Asn Phe Leu Tyr Gly Asn Glu Val Ser Tyr Glu Cys Asp Gln Gly Phe
 740 745 750
 Tyr Leu Leu Gly Glu Lys Lys Leu Gln Cys Arg Ser Asp Ser Lys Gly
 755 760 765
 His Gly Ser Trp Ser Gly Pro Ser Pro Gln Cys Leu Arg Ser Pro Pro
 770 775 780
 Val Thr Arg Cys Pro Asn Pro Glu Val Lys His Gly Tyr Lys Leu Asn
 785 790 795 800
 Lys Thr His Ser Ala Tyr Ser His Asn Asp Ile Val Tyr Val Asp Cys
 805 810 815
 Asn Pro Gly Phe Ile Met Asn Gly Ser Arg Val Ile Arg Cys His Thr
 820 825 830

ES 2 392 511 T3

Asp	Asn	Thr	Trp	Val	Pro	Gly	Val	Pro	Thr	Cys	Met	Lys	Lys	Ala	Phe
		835					840					845			
Ile	Gly	Cys	Pro	Pro	Pro	Pro	Lys	Thr	Pro	Asn	Gly	Asn	His	Thr	Gly
	850					855					860				
Gly	Asn	Ile	Ala	Arg	Phe	Ser	Pro	Gly	Met	Ser	Ile	Leu	Tyr	Ser	Cys
865					870					875					880
Asp	Gln	Gly	Tyr	Leu	Leu	Val	Gly	Glu	Ala	Leu	Leu	Leu	Cys	Thr	His
				885						890					895
Glu	Gly	Thr	Trp	Ser	Gln	Pro	Ala	Pro	His	Cys	Lys	Glu	Val	Asn	Cys
			900						905				910		
Ser	Ser	Pro	Ala	Asp	Met	Asp	Gly	Ile	Gln	Lys	Gly	Leu	Glu	Pro	Arg
		915					920					925			
Lys	Met	Tyr	Gln	Tyr	Gly	Ala	Val	Val	Thr	Leu	Glu	Cys	Glu	Asp	Gly
	930					935						940			
Tyr	Met	Leu	Glu	Gly	Ser	Pro	Gln	Ser	Gln	Cys	Gln	Ser	Asp	His	Gln
945					950					955					960
Trp	Asn	Pro	Pro	Leu	Ala	Val	Cys	Arg	Ser	Arg	Ser	Leu	Ala	Pro	Val
				965						970					975
Leu	Cys	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Leu	Ile	Leu	Leu	Thr	Phe	Leu	Ile	Val
			980						985					990	
Ile	Thr	Leu	Tyr	Val	Ile	Ser	Lys	His	Arg	Glu	Arg	Asn	Tyr	Tyr	Thr
		995						1000					1005		
Asp	Thr	Ser	Gln	Lys	Glu	Ala	Phe	His	Leu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Tyr
	1010						1015					1020			
Ser	Val	Asp	Pro	Tyr	Asn	Pro	Ala	Ser							
1025						1030									

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un constructo, en la que el constructo comprende:

(a) una CR2 o un fragmento de la misma, en el que el fragmento contiene al menos los dos primeros dominios de repeticiones de consenso cortas (SCR) N-terminales de la proteína CR2; y

5 (b) un modulador de la actividad del complemento, en el que la modulación de la actividad del complemento comprende un inhibidor del complemento o fragmento del mismo, en el que dicho inhibidor del complemento se selecciona del factor acelerador del decaimiento (DAF), CD59 humana, CD59 de ratón, Crry, proteína cofactor de membrana (MCP), receptor 1 del complemento (CR1) y un anticuerpo anti-C5, en
10 el que el fragmento del mismo comprende SCRs 1-4 de DAF, SCRs 2-4 de DAF, CD59 humana soluble sin su anclaje de glucofosfatidilinositol, CD59 de ratón soluble sin su anclaje de glucofosfatidilinositol, SCRs 1-5 de Crry, SCRs 1-4 de MCP, SCRs 1-4 de CR1, SCRs 8-11 de CR1, SCRs 15-18 de CR1 o el sitio de unión C1q de CR1.

2. La composición de la reivindicación 1, en la que la CR2 o su fragmento comprende los cuatro dominios de SCR N-terminales de la proteína CR2.

15 3. La composición de la reivindicación 1 ó 2, en la que la CR2 comprende una proteína CR2 de longitud completa.

4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el constructo es una proteína de fusión.

5. La composición de la reivindicación 4, en la que la CR2 o su fragmento se fusiona al término N o al término C del inhibidor del complemento o su fragmento.

20 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 8 SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 16 o SEC ID NO: 14.

7. La composición de la reivindicación 1, en la que el inhibidor del complemento o su fragmento es CD59 murina, CD59 murina sin su anclaje de glucofosfatidilinositol, CD59 humana sin su anclaje glucofosfatidilinositol, o CD59 humana.

25 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso en un método para tratar una afección afectada por el complemento.

9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en un método para tratar una infección vírica, una infección fúngica o una afección inflamatoria.

10. La composición de la reivindicación 9, en la que la afección inflamatoria es apoplejía o lesión por reperusión isquémica.

30 11. Una secuencia nucleotídica que codifica la proteína de fusión de la reivindicación 4.

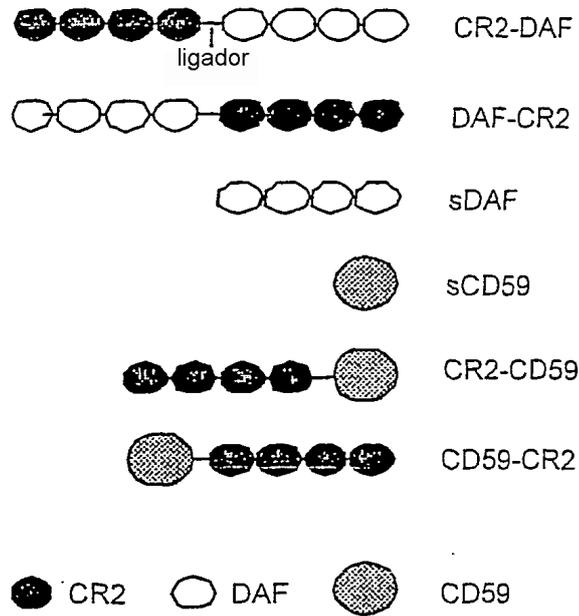


FIGURA 1

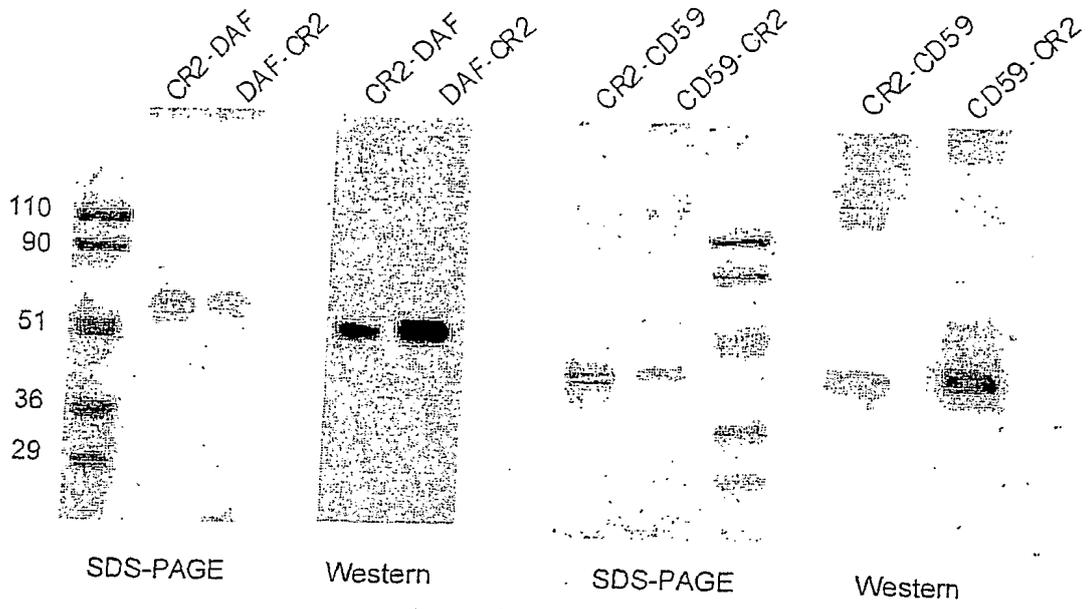


FIGURA 2

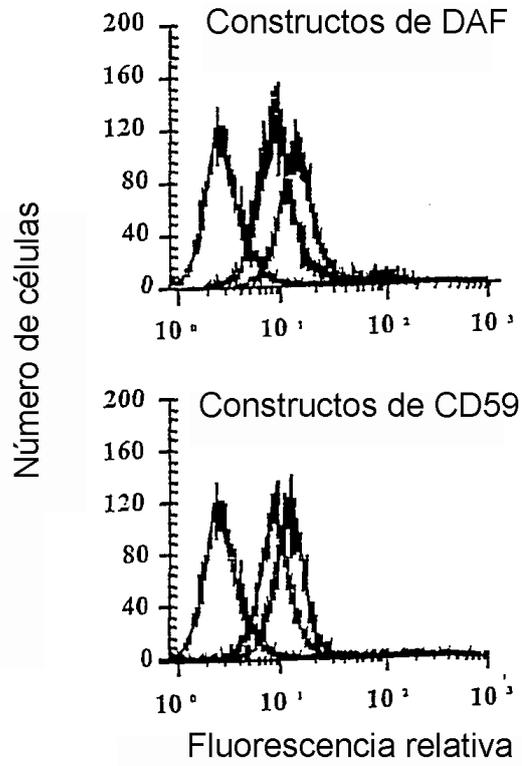


FIGURA 3

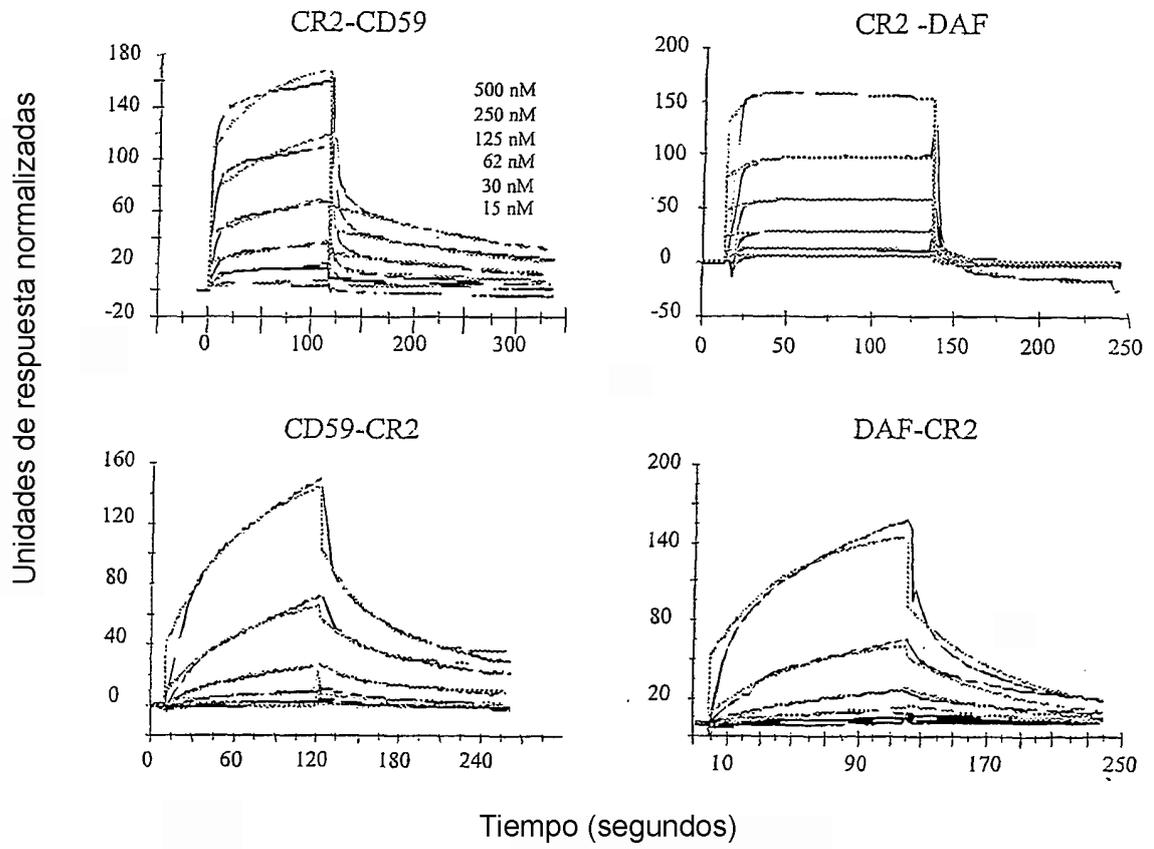


FIGURA 4

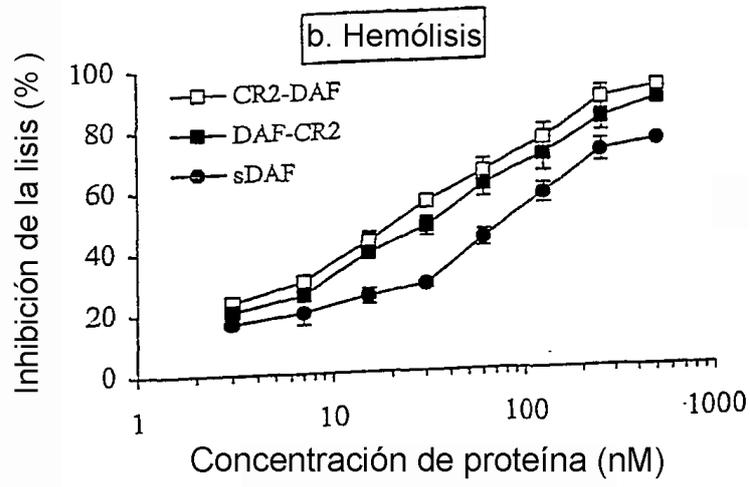
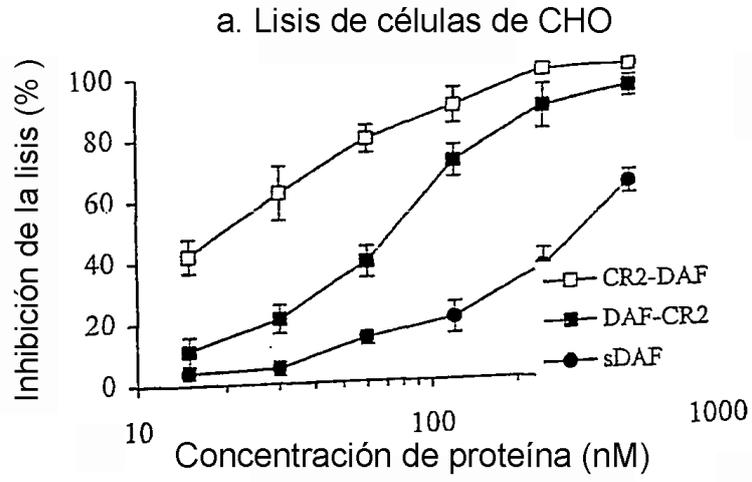


FIGURA 5

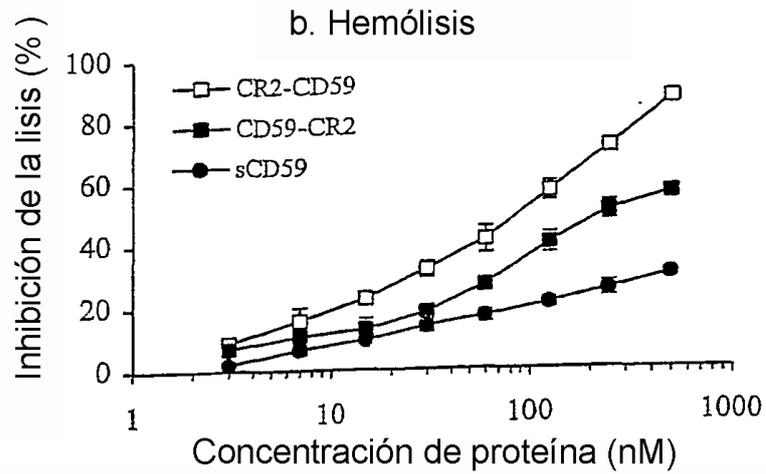
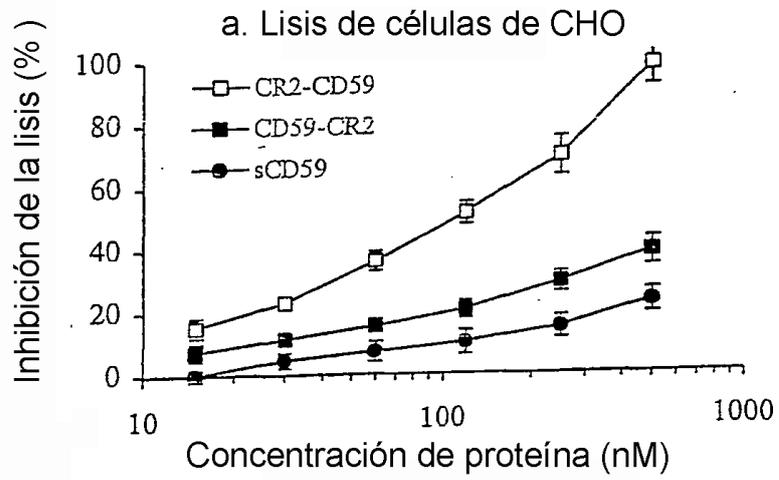


FIGURA 6

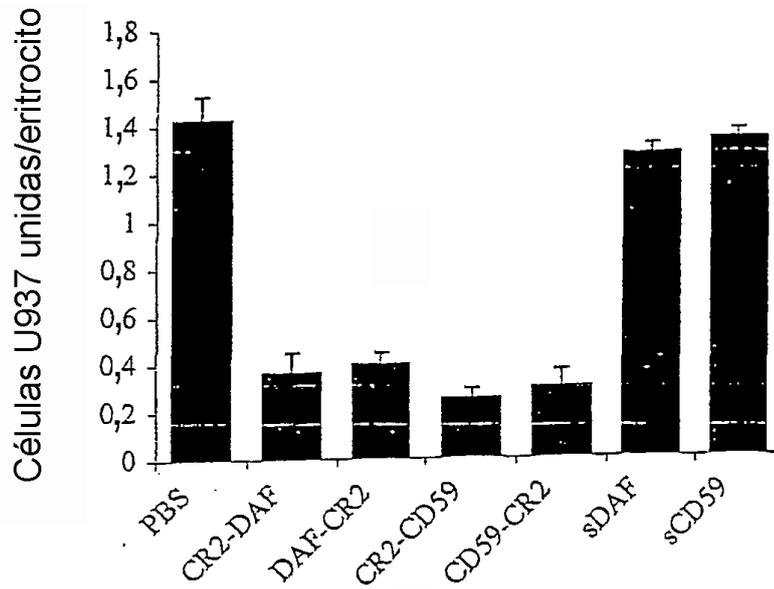


FIGURA 7

Secuencia: CR2DAF Longitud: 1530

```

ATT TCT TGT GGC TCT CCT CCG CCT ATC CTA AAT GGC CGG ATT AGT 45
I S G G S P P P I L N G R I S
TAT TAT TCT ACC CCC ATT GCT GTT GGT ACC GTG ATA AGG TAC AGT 90
Y Y S T P I A V G T V I R Y S
TGT TCA GGT ACC TTC CGC CTC ATT GGA GAA AAA AGT CTA TTA TGC 135
C S G T F R L I G E K S L L C
ATA ACT AAA GAC AAA GTG GAT GGA ACC TGG GAT AAA CCT GCT CCT 180
I T K D K V D G T W D K P A P
AAA TGT GAA TAT TTC AAT AAA TAT TCT TCT TGC CCT GAG CCC ATA 225
K C E Y F N K Y S S C P E P I
GTA CCA GGA GGA TAC AAA ATT AGA GGC TCT ACA CCC TAC AGA CAT 270
V P G G Y K I R G S T P Y R H
GGT GAT TCT GTG ACA TTT GCC TGT AAA ACC AAC TTC TCC ATG AAC 315
G D S V T F A C K T N F S M N
GGA AAC AAG TCT GTT TGG TGT CAA GCA AAT AAT ATG TGG GGG CCG 360
G N K S V W C Q A N N M W G P
ACA CGA CTA CCA ACC TGT GTA AGT GTT TTC CCT CTC GAG TGT CCA 405
T R L P T C V S V F P L E C P
GCA CTT CCT ATG ATC CAC AAT GGA CAT CAC ACA AGT GAG AAT GTT 450
A L P M I H N G H H T S E N V
GGC TCC ATT GCT CCA GGA TTG TCT GTG ACT TAC AGC TGT GAA TCT 495
G S I A P G L S V T Y S C E S
GGT TAC TTG CTT GTT GGA GAA AAG ATC ATT AAC TGT TTG TCT TCG 540
G Y L L V G E K I I N C L S S
GGA AAA TGG AGT GCT GTC CCC CCC ACA TGT GAA GAG GCA CGC TGT 585
G K W S A V P P T C E E A R C
AAA TCT CTA GGA CGA TTT CCC AAT GGG AAG GTA AAG GAG CCT CCA 630
K S L G R F P N G K V K E P P
ATT CTC CGG GTT GGT GTA ACT GCA AAC TTT TTC TGT GAT GAA GGG 675
I L R V G V T A N F F C D E G
TAT CGA CTG CAA GGC CCA CCT TCT AGT CGG TGT GTA ATT GCT GGA 720
Y R L Q G P P S S R C V I A G
CAG GGA GTT GCT TGG ACC AAA ATG CCA GTA TGT GGA GGT GGG TCG 765
Q G V A W T K M P V C G G G S
GGT GGC GGC GGA TCC GAC TGT GGC CTT CCC CCA GAT GTA CCT AAT 810
G G G G S D C G L P P D V P N
GCC CAG CCA GCT TTG GAA GGC CGT ACA AGT TTT CCC GAG GAT ACT 855
A Q P A L E G R T S F P E D T
GTA ATA ACG TAC AAA TGT GAA GAA AGC TTT GTG AAA ATT CCT GGC 900
V I T Y K C E S F V K I P G
GAG AAG GAC TCA GTG ATC TGC CTT AAG GGC AGT CAA TGG TCA GAT 945
E K D S V I C L K G S Q W S D
ATT GAA GAG TTC TGC AAT CGT AGC TGC GAG GTG CCA ACA AGG CTA 990
I E E F C N R S C E V P T R L
AAT TCT GCA TCC CTC AAA CAG CCT TAT ATC ACT CAG AAT TAT TTT 1035
N S A S L K Q P Y I T Q N Y F
CCA GTC GGT ACT GTT GTG GAA TAT GAG TGC CGT CCA GGT TAC AGA 1080
P V G T V V E Y E G R P G Y R
AGA GAA CCT TCT CTA TCA CCA AAA CTA ACT TGC CTT CAG AAT TTA 1125
R E P S L S P K L T C L Q N L
AAA TGG TCC ACA GCA GTC GAA TTT TGT AAA AAG AAA TCA TGC CCT 1170
K W S T A V E F C K K S C P
AAT CCG GGA GAA ATA CGA AAT GGT CAG ATT GAT GTA CCA GGT GGC 1215
N P G E I R N G Q I D V P G G
ATA TTA TTT GGT GCA ACC ATC TCC TTC TCA TGT AAC ACA GGG TAC 1260
I L F G A T I S F S C N T G Y
AAA TTA TTT GGC TCG ACT TCT AGT TTT TGT CTT ATT TCA GGC AGC 1305
K L F G S T S S F C L I S G S
TCT GTC CAG TGG AGT GAC CCG TTG CCA GAG TGC AGA GAA ATT TAT 1350
S V Q W S D P L P E C R E I Y
TGT CCA GCA CCA CCA CAA ATT GAC AAT GGA ATA ATT CAA GGG GAA 1395
C P A P P Q I D N G I I Q G E
CGT GAC CAT TAT GGA TAT AGA CAG TCT GTA ACG TAT GCA TGT AAT 1440
R D H Y G Y R Q S V T Y A C N
AAA GGA TTC ACC ATG ATT GGA GAG CAC TCT ATT TAT TGT ACT GTG 1485
K G F T M I G E H S I Y C T V
AAT AAT GAT GAA GGA GAG TGG AGT GGC GCA CCA CCT GAA TGC AGA 1530
N N D E G E W S G P P P E C R

```

FIGURA 8

ES 2 392 511 T3

Secuencia: CR2CD59 Longitud: 1002

ATT TCT TGT GGC TCT CCT CCG CCT ATC CTA AAT GGC CGG ATT AGT 45
I S C G S P P P I L N G R I S
TAT TAT TCT ACC CCC ATT GCT GTT GGT ACC GTG ATA AGG TAC AGT 90
Y Y S T P I A V G T V J R Y S
TGT TCA GGT ACC TTC CGC CTC ATT GGA GAA AAA AGT CTA TTA TGC 135
C S G T F R L I G E K S L L C
ATA ACT AAA GAC AAA GTG GAT GGA ACC TGG GAT AAA CCT GCT CCT 180
I T K D K V D G T W D K P A P
AAA TGT GAA TAT TTC AAT AAA TAT TCT TCT TGC CCT GAG CCC ATA 225
K C E Y F N K Y S S C P E P I
GTA CCA GGA GGA TAC AAA ATT AGA GGC TCT ACA CCC TAC AGA CAT 270
V P G G Y K J R C S T P Y R H
GGT GAT TCT GTG ACA TTT GCC TGT AAA ACC AAC TTC TCC ATG AAC 315
G D S V T F A C K T N F S M N
GGA AAC AAG TCT GTT TGG TGT CAA GCA AAT AAT ATG TGG GGG CCG 360
G N K S V W C Q A N N M W G P
ACA CGA CTA CCA ACC TGT GTA AGT GTT TTC CCT CTC GAG TGT CCA 405
T R L P T C V S V F P L E C P
GCA CTT CCT ATG ATC CAC AAT GGA CAT CAC ACA AGT GAG AAT GTT 450
A L P M J H N G H H T S E N V
GGC TCC ATT GCT CCA GGA TTG TCT GTG ACT TAC AGC TGT GAA TCT 495
G S I A P G L S V T Y S C E S
GGT TAC TTG CTT GTT GGA GAA AAG ATC ATT AAC TGT TTG TCT TCG 540
G Y L L V G E K J I N C L S S
GGA AAA TGG AGT GCT GTC CCC CCC ACA TGT GAA GAG GCA CGC TGT 585
G K W S A V P P T C E E A R C
AAA TCT CTA GGA CGA TTT CCC AAT GGG AAG GTA AAG GAG CCT CCA 630
K S L G R F P N G K V K E P P
ATT CTC CGG GTT GGT GTA ACT GCA AAC TTT TTC TGT GAT GAA GGG 675
I L R V G V T A N F F C D E G
TAT CGA CTG CAA GGC CCA CCT TCT AGT CGG TGT GTA ATT GCT GGA 720
Y R L Q G P P S S R C V J A G
CAG GGA GTT GCT TGG ACC AAA ATG CCA GTA TGT TCA GGA GGA GGA 765
Q G V A W T K M P V C S G G G
GGT TCC CTG CAG TGC TAC AAC TGT CCT AAC CCA ACT GCT GAC TGC 810
G S L Q C Y N C P N P T A D C
AAA ACA GCC GTC AAT TGT TCA TCT GAT TTT GAT GCG TGT CTC ATT 855
K T A V N C S S D F D A C L I
ACC AAA GCT GGG TTA CAA GTG TAT AAC AAG TGT TGG AAG TTT GAG 900
T K A G L Q V Y N K C W K F E
CAT TGC AAT TTC AAC GAC GTC ACA ACC CGC TTG AGG GAA AAT GAG 945
H C N F N D V T T R L R E N E
CTA ACG TAC TAC TGC TGC AAG AAG GAC CTG TGT AAC TTT AAC GAA 990
L T Y Y C C K K D L C N F N E
CAG CTT GAA AAT 1035
Q L E N

FIGURA 9

Secuencia: DAFCR2 Longitud: 1554

```

GAC TGT GGC CTT CCC CCA GAT GTA CCT AAT GCC CAG CCA GCT TTG 45
D C G L P P D V P N A Q P A L
GAA GGC CGT ACA AGT TTT CCC GAG GAT ACT GTA ATA ACG TAC AAA 90
E G R T S F P E D T V I T Y K
TGT GAA GAA AGC TTT GTG AAA ATT CCT GGC AAG GAC TCA GTG 135
C E E S F V K I P G E K D S V
ATC TGC CTT AAG GGC AGT CAA TGG TCA GAT ATT GAA GAG TTC TGC 180
I C L K G S O W S D I E F C
AAT CGT AGC TGC GAG GTG CCA ACA AGG CTA AAT TCT GCA TCC CTC 225
N R S C E V P T R L N S A S L
AAA CAG CCT TAT ATC ACT CAG AAT TAT TTT CCA GTC GGT ACT GTT 270
K O P Y I T O N Y F P V G T V
GTG GAA TAT GAG TGC CGT CCA GGT TAC AGA AGA GAA CCT TCT CTA 315
V E Y E C R P G Y R R E P S L
TCA CCA AAA CTA ACT TGC CTT CAG AAT TTA AAA TGG TCC ACA GCA 360
S P K L T C L A Q N L K W S T A
GTC GAA TTT TGT AAA AAG AAA TCA TGC CCT AAT CCG GGA GAA ATA 405
V E F C K K K S C P N P G E I
CGA AAT GGT CAG ATT GAT GTA CCA GGT GGC ATA TTA TTT GGT GCA 450
R N G Q I D V P G G I L F G A
ACC ATC TCC TTC TCA TGT AAC ACA GGG TAC AAA TTA TTT GGC TCG 495
T I S F S C N T G Y K L F G S
ACT TCT AGT TTT TGT CTT ATT TCA GGC AGC TCT GTC CAG TGG AGT 540
T S S F C L I S G S S V Q W S
GAC CCG TTG CCA GAG TGC AGA GAA ATT TAT TGT CCA GCA CCA CCA 585
D P L P C R E J Y P A P P
CAA ATT GAC AAT GGA ATA ATT CAA GGG GAA GGT GAC CAT TAT GGA 630
Q I D N G I I Q G E R D H Y G
TAT AGA CAG TCT GTA ACG TAT GCA TGT AAT AAA GGA TTC ACC ATG 675
Y R Q S V T Y A C N K G F T M
ATT GGA GAG CAC TCT ATT TAT TGT ACT GTG AAT AAT GAT GAA GGA 720
I G E H S I Y C T V N N D E G
GAG TGG AGT GGC CCA CCA CCT GAA TGC AGA TCC TCT GGT GGC GGT 765
E W S G P P P E C R S S G G G
GGC TCG GGC GGA GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCC ATT TCT TGT 810
G S G G G G S G G G S J S C
GGC TCT CCT CCG CCT ATC CTA AAT GGC CGG ATT AGT TAT TAT TCT 855
G S P P P I L N G R I S Y Y S
ACC CCC ATT GCT GTT GGT ACC GTG ATA AGG TAC AGT TGT TCA GGT 900
T P I A V G T V I R Y S C S G
ACC TTC CGC CTC ATT GGA GAA AAA AGT CTA TTA TGC ATA ACT AAA 945
F R L I G E K S L L C I T K
GAC AAA GTG GAT GGA ACC TGG GAT AAA CCT GCT CCT AAA TGT GAA 990
D K V D G T W D K P A P K C E
TAT TTC AAT AAA TAT TCT TCT TGC CCT GAG CCC ATA GTA CCA GGA 1035
Y F N K Y S S C P E P I V P G
GGA TAC AAA ATT AGA GGC TCT ACA CCC TAC AGA CAT GGT GAT TCT 1080
G Y K I R G S T P Y R H G D S
GTG ACA TTT GCC TGT AAA ACC AAC TTC TCC ATG AAC GGA AAC AAG 1125
V T F A C K T N F S M N G N K
TCT GTT TGG TGT CAA GCA AAT AAT ATG TGG GGG CCG ACA CGA CTA 1170
S V W C Q A N N M W G P T R L
CCA ACC TGT GTA AGT GTT TTC CCT CTC GAG TGT CCA GCA CTT CCT 1215
P T C V S V F P L E C P A L P
ATG ATC CAC AAT GGA CAT CAC ACA AGT GAG AAT GTT GGC TCC ATT 1260
M I H N G H H T S E N V G S I
GCT CCA GGA TTG TCT GTG ACT TAC AGC TGT GAA TCT GGT TAC TTG 1305
A P G L S V T Y S C E S G Y L
CTT GTT GGA GAA AAG ATC ATT AAC TGT TTG TCT TCG GGA AAA TGG 1350
L V G E K I N C L S S G K W
AGT GCT GTC CCC CCC ACA TGT GAA GAG GCA CGC TGT AAA TCT CTA 1395
S A V P P T C E E A R C K S L
GGA CGA TTT CCC AAT GGG AAG GTA AAG GAG CCT CCA ATT CTC CGG 1440
G R F P N G K V K F P P I L R
GTT GGT GTA ACT GCA AAC TTT TTC TGT GAT GAA GGG TAT CGA CTG 1485
V G V T A N F C D E G Y R L
CAA GGC CCA CCT TCT AGT CGG TGT GTA ATT GCT GGA CAG GGA GTT 1530
Q G P P S S R C V I A G Q G V
GCT TGG ACC AAA ATG CCA GTA TGT 1554
A W T K M P V C
    
```

FIGURA 10

ES 2 392 511 T3

Secuencia: CD59CR2 Longitud: 1035
CTG CAG TGC TAC AAC TGT CCT AAC CCA ACT GCT GAC TGC AAA ACA 45
L Q C Y N C P N P T A D C K T
GCC GTC AAT TGT TCA TCT GAT TTT GAT GCG TGT CTC ATT ACC AAA 90
A V N C S S D F D A C L I T K.
GCT GGG TTA CAA GTG TAT AAC AAG TGT TGG AAG TTT GAG CAT TGC 135
A G L Q V Y N K C W K F E H C
AAT TTC AAC GAC GTC ACA ACC CGC TTG AGG GAA AAT GAG CTA ACG 180
N F N D V T T R L R E N E L T
TAC TAC TGC TGC AAG AAG GAC CTG TGT AAC TTT AAC GAA CAG CTT 225
Y Y C C K K D L C N F N E Q L
GAA AAT TCC TCT GGT GGC GGT GGC TCC GGC GGA GGT GGG TCC GGT 270
E N S S G G G G S G G G G S G
GGC GGC GGA TCC ATT TCT TGT GGC TCT CCT CCG CCT ATC CTA AAT 315
G G G S I S C G S P P P I L N
GGC CGG ATT AGT TAT TAT TCT ACC CCC ATT GCT GTT GGT ACC GTG 360
G R I S Y Y S T P I A V G T V
ATA AGG TAC AGT TGT TCA GGT ACC TTC CGC CTC ATT GGA GAA AAA 405
I R Y S C S G T F R L I G E K
AGT CTA TTA TGC ATA ACT AAA GAC AAA GTG GAT GGA ACC TGG GAT 450
S L L C I T K D K V D G T W D
AAA CCT GCT CCT AAA TGT GAA TAT TTC AAT AAA TAT TCT TCT TGC 495
K P A P K C E Y F N K Y S S C
CCT GAG CCC ATA GTA CCA GGA GGA TAC AAA ATT AGA GGC TCT ACA 540
P E P I V P G G Y K I R G S T
CCC TAC AGA CAT GGT GAT TCT GTG ACA TTT GCC TGT AAA ACC AAC 585
P Y R H G D S V T F A C K T N
TTC TCC ATG AAC GGA AAC AAG TCT GTT TGG TGT CAA GCA AAT AAT 630
F S M N G N K S V W C Q A N N
ATG TGG GGG CCG ACA CGA CTA CCA ACC TGT GTA AGT GTT TTC CCT 675
M W G P T R L P T C V S V F P
CTC GAG TGT CCA GCA CTT CCT ATG ATC CAC AAT GGA CAT CAC ACA 720
L E C P A L P M I H N G H H T
AGT GAG AAT GTT GGC TCC ATT GCT CCA GGA TTG TGT GTG ACT TAC 765
S E N V G S I A P G L S V T Y
AGC TGT GAA TCT GGT TAC TTG CTT GTT GGA GAA AAG ATC ATT AAC 810
S C E S G Y L L V G E K I I N
TGT TTG TCT TCG GGA AAA TGG AGT GCT GTC CCC CCC ACA TGT GAA 855
C L S S G K W S A V P P T C E
GAG GCA CGC TGT AAA TCT CTA GGA CGA TTT CCC AAT GGG AAG GTA 900
E A R C K S L G R F P N G K V
AAG GAG CCT CCA ATT CTC CGG GTT GGT GTA ACT GCA AAC TTT TTC 945
K E P P J L R V G V T A N F F
TGT GAT GAA GGG TAT CGA CTG CAA GGC CCA CCT TCT AGT CGG TGT 990
C D E G Y R L Q G P P S S R C.
1035

FIGURA 11

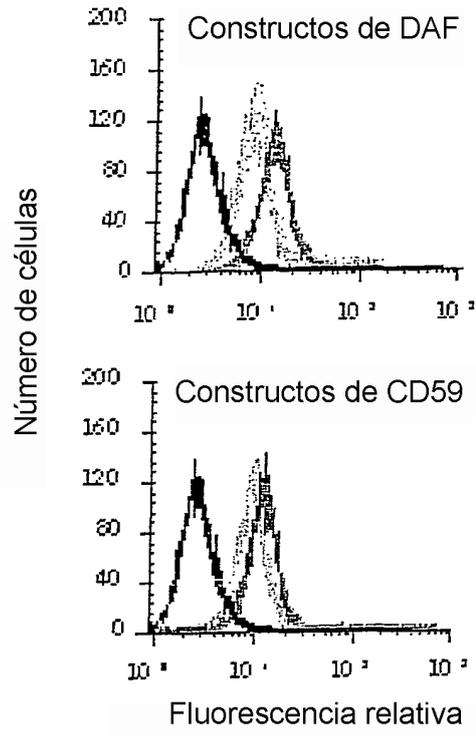


FIGURA 12

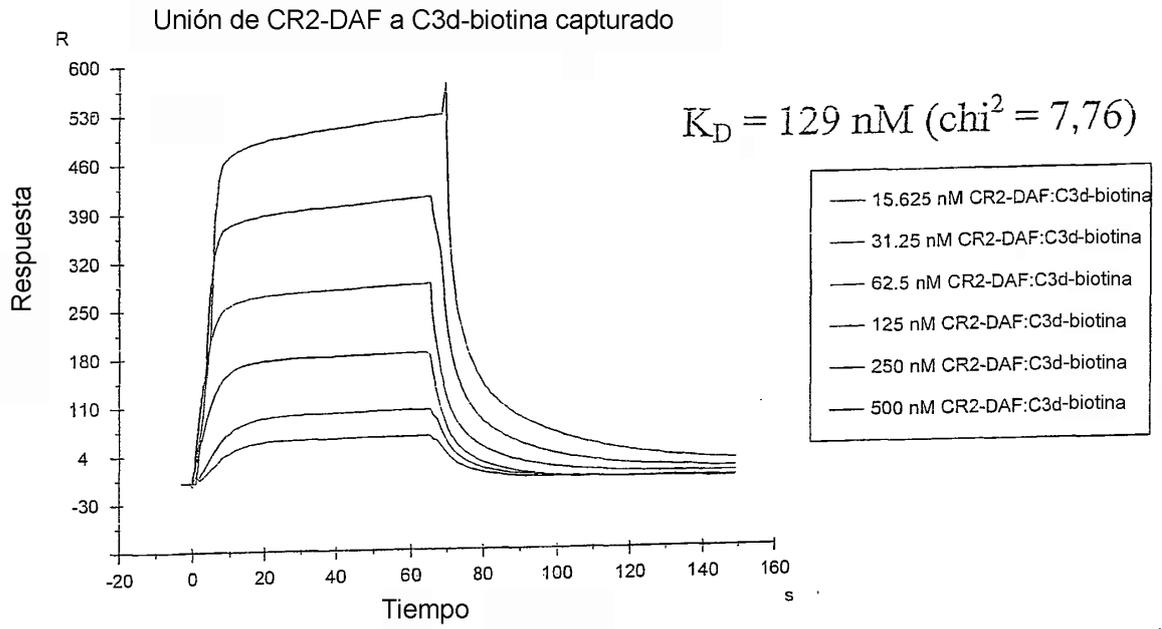


FIGURA 13

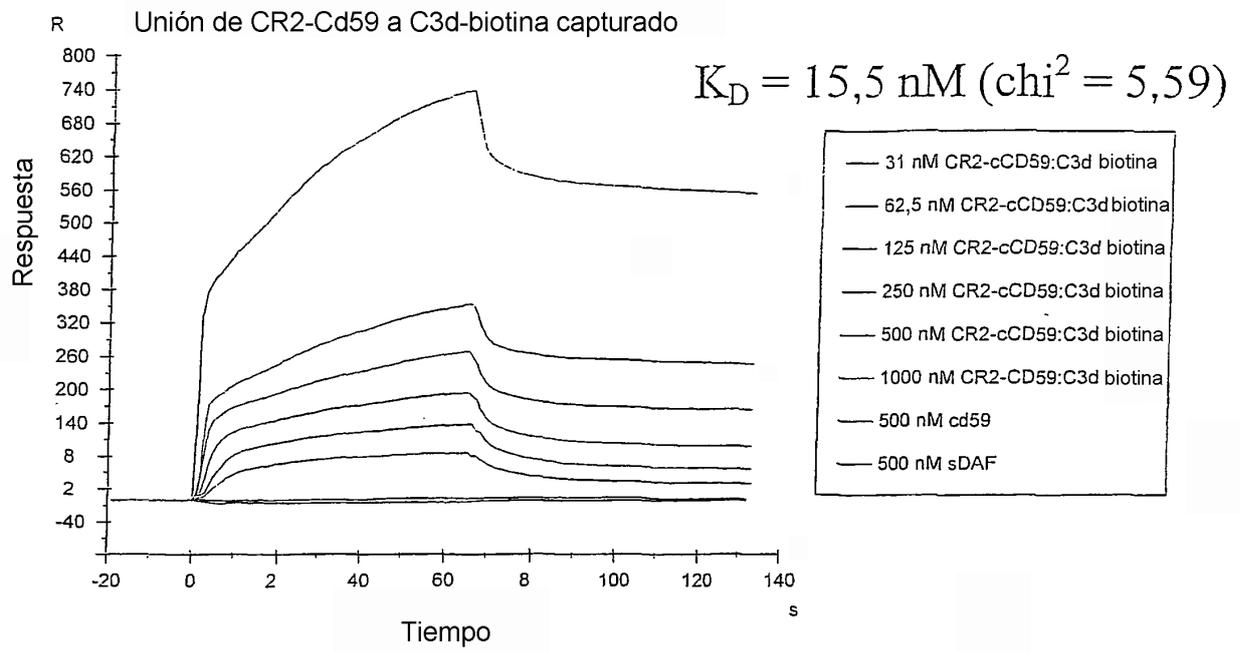


FIGURA 14

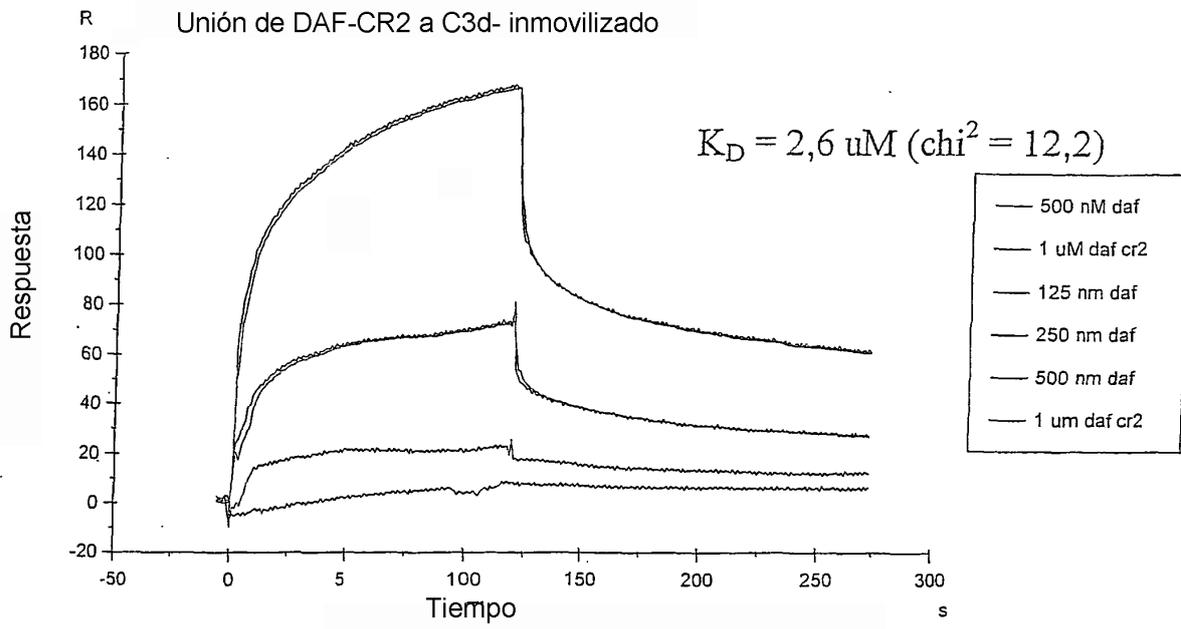


FIGURA 15

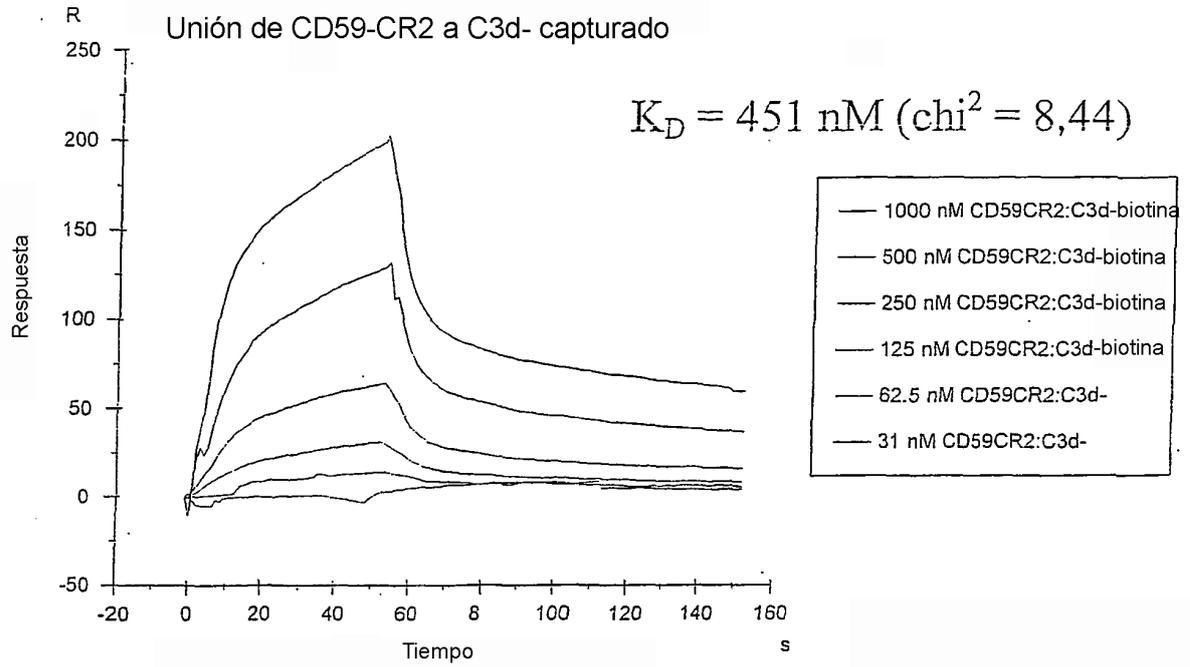


FIGURA 16

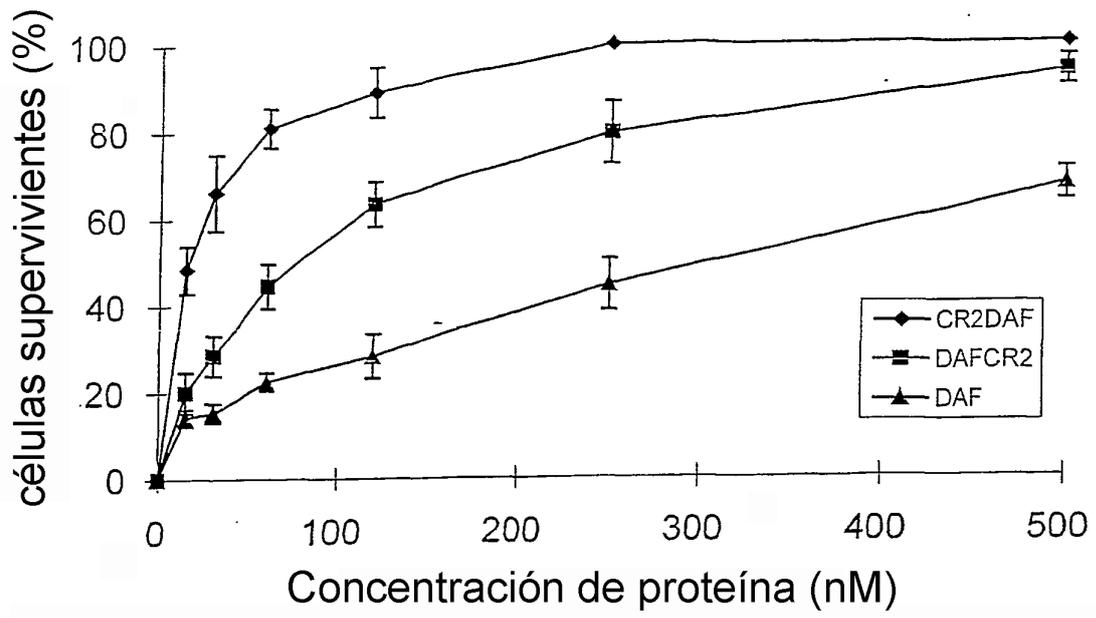


FIGURA 17

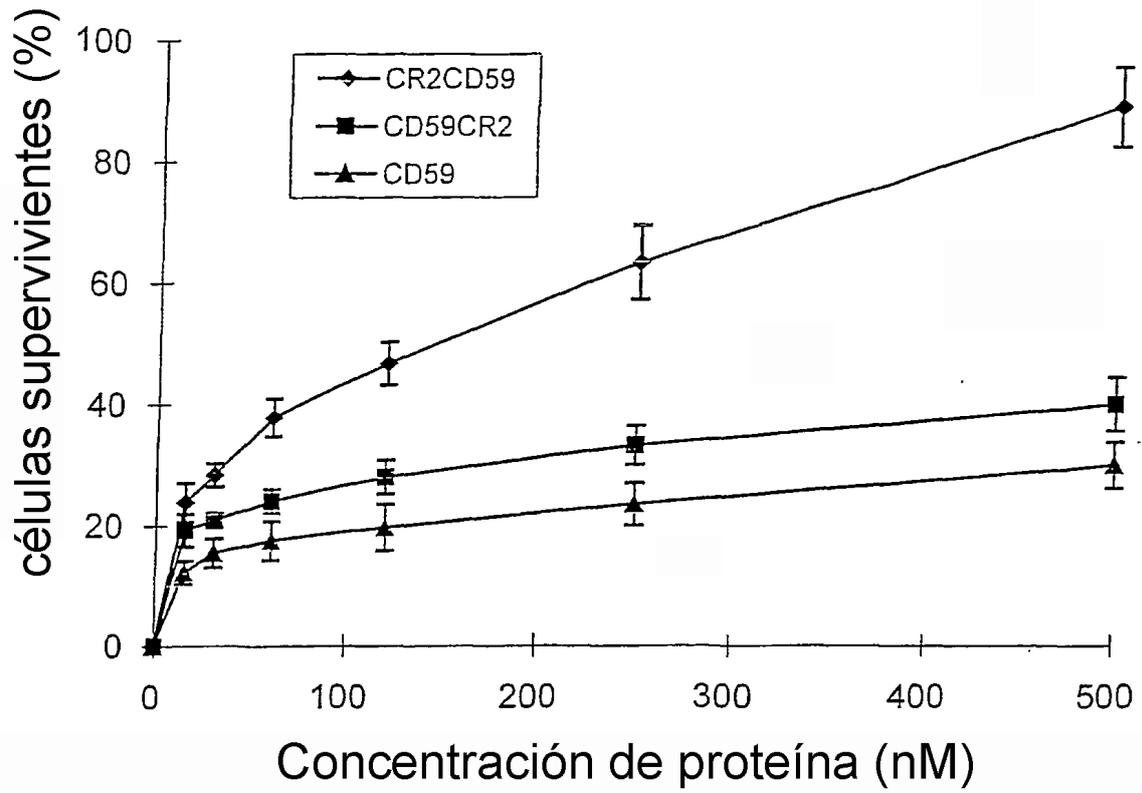


FIGURA 18

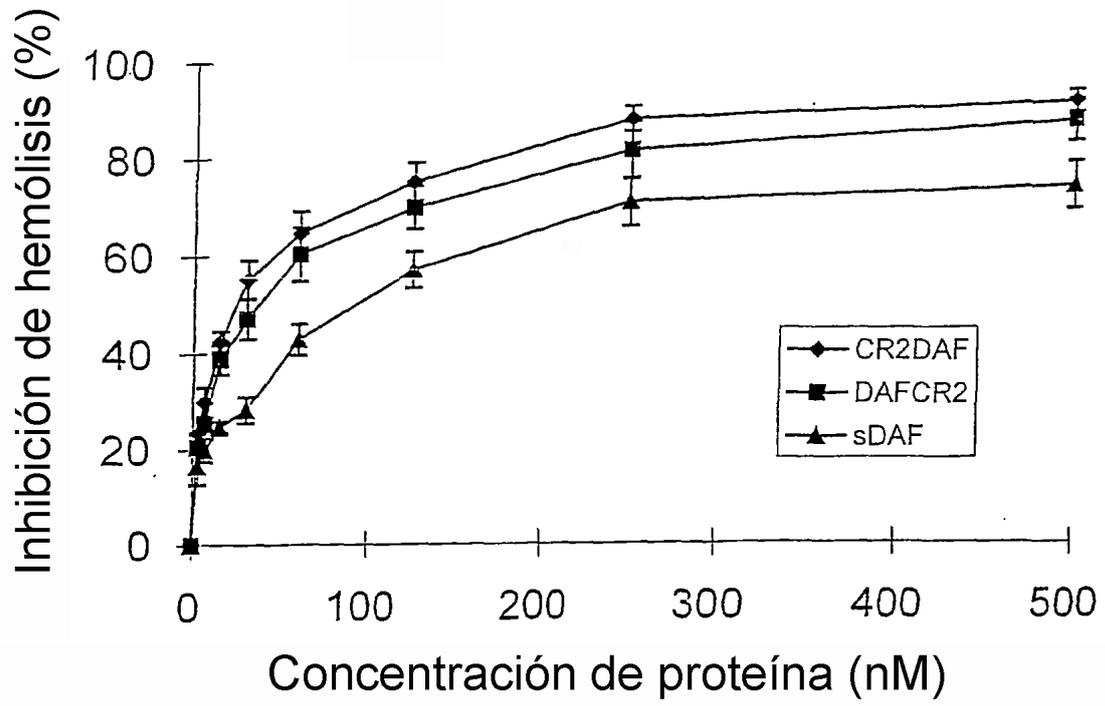


FIGURA 19

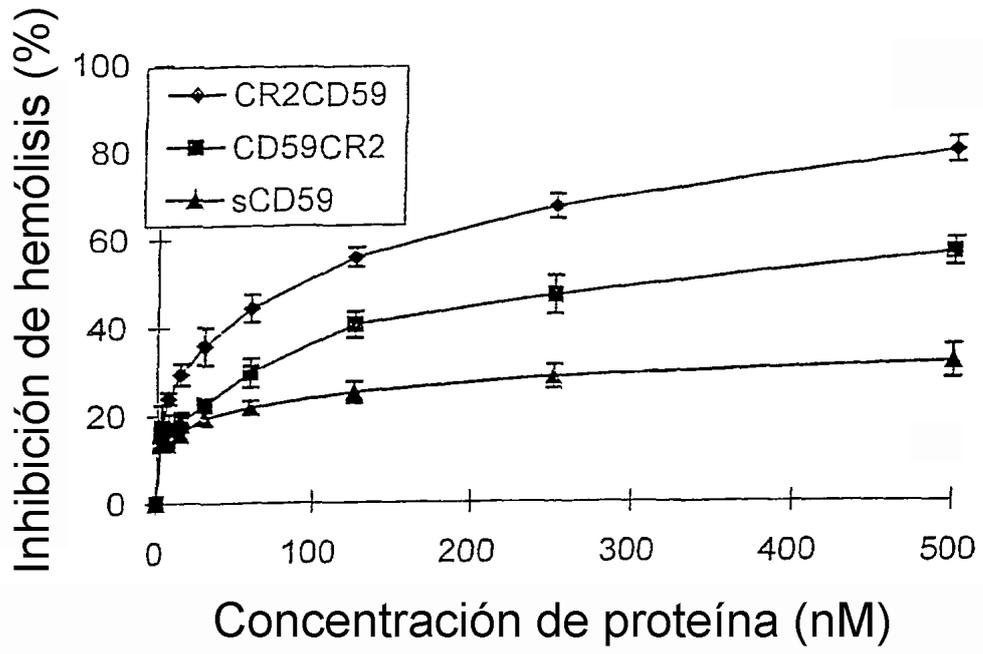


FIGURA 20

Secuencia: CR2Fc Longitud: 1530

ATG	GGC	GCC	GCG	GGC	CTG	CTC	GGG	GTT	TTC	TTG	GCT	CTC	GTC	GCA	45
M	G	A	A	G	L	L	G	V	F	L	A	L	V	A	
CGG	GGG	GTC	CTC	GGG	ATT	TCT	TGT	GGC	TCT	CCT	CCG	CCT	ATC	CTA	90
P	G	V	L	G	I	S	C	G	S	P	P	P	I	L	
AAT	GGC	CGG	ATT	AGT	TAT	TAT	TCT	ACC	CCC	ATT	GCT	GTT	GGT	ACC	135
N	G	R	I	S	Y	Y	S	T	P	I	A	V	G	T	
GTG	ATA	AGG	TAC	AGT	TGT	TCA	GGT	ACC	TTC	CGC	CTC	ATT	GGA	GAA	180
V	I	R	Y	S	C	S	G	T	F	R	L	G	I	G	
AAA	AGT	CTA	TTA	TGC	ATA	ACT	AAA	GAC	AAA	GTG	GAT	GGA	ACC	TGG	225
K	S	L	L	C	I	T	K	D	K	V	D	G	T	T	
GAT	AAA	CCT	GCT	CCT	AAA	TGT	GAA	TAT	TTC	AAT	AAA	TAT	TCT	TCT	270
D	K	P	A	P	K	C	E	Y	F	N	K	Y	S	S	
TGC	CCT	GAG	CCC	ATA	GTA	CCA	GGA	GGA	TAC	AAA	ATT	AGA	GGC	TCT	315
C	P	E	P	I	V	P	G	G	Y	K	I	R	G	S	
ACA	CCC	TAC	AGA	CAT	GGT	GAT	TCT	GTG	ACA	TTT	GCC	TGT	AAA	ACC	360
T	AAC	TTC	TCC	ATG	AAC	GGA	AAC	AAG	TCT	GTT	TGG	TGT	CAA	GCA	405
N	F	S	M	N	G	N	K	S	V	W	C	Q	A	N	
AAT	ATG	TGG	GGG	CCG	ACA	CGA	CTA	CCA	ACC	TGT	GTA	AGT	GTT	TTC	450
N	M	W	G	P	T	R	L	P	T	C	V	S	V	F	
CCT	CTC	GAG	TGT	CCA	GCA	CTT	CCT	ATG	ATC	CAC	AAT	GGA	CAT	CAC	495
P	L	E	C	P	A	L	P	M	I	H	N	G	H	H	
ACA	AGT	GAG	AAT	GTT	GGC	TCC	ATT	GCT	CCA	GGA	TTG	TCT	GTG	ACT	540
T	S	E	N	V	G	S	I	A	P	G	L	S	V	T	
TAC	AGC	TGT	GAA	TCT	GGT	TAC	TTG	CTT	GTT	GGA	GAA	AAG	ATC	ATT	585
Y	S	C	E	S	G	Y	L	L	V	G	E	K	I	J	
AAC	TGT	TTG	TCT	TCG	GGG	AAA	TGG	AGT	GCT	GTG	CCC	CCC	ACA	TGT	630
N	C	L	S	S	G	K	W	S	A	V	P	P	F	C	
GAA	GAG	GCA	CGC	TGT	AAA	TCT	CTA	GGA	CGA	TTT	CCC	AAT	GGG	AAG	675
E	A	R	C	K	S	L	G	R	F	P	N	G	K	K	
GTA	AAG	GAG	CCT	CCA	ATT	CTC	CGG	GTT	GGT	GTA	ACT	GCA	AAC	TTT	720
V	K	E	P	P	J	L	R	V	G	V	T	A	F	F	
TTG	TGT	GAT	GAA	GGG	TAT	CGA	CTG	CAA	GGC	CCA	CCT	TCT	AGT	CGG	765
F	C	D	E	G	Y	R	L	Q	TGG	ACC	AAA	ATG	CCA	GTA	810
TGT	GTA	ATT	GCT	GGA	Q	G	V	A	W	T	K	H	P	V	
C	V	I	A	G	Q	G	V	A	W	T	K	H	P	V	
TGT	GAA	GAA	ATT	TTT	TGC	CCA	CTG	CGG	CCG	CAG	TCT	AGA	GAC	AAA	855
C	E	E	I	F	C	P	L	R	P	Q	S	R	D	K	
ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCG	TGC	CCA	GCA	CCT	GAA	CTC	CTG	GGG	GGA	900
T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	
CCG	TCA	GTC	TTG	CTC	TTG	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	945
P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	
ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACA	TGC	GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	990
I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	
CAC	GAA	GAC	CCT	GAG	GTG	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAC	GGC	GTG	1035
H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	
GAG	GTG	CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TAC	AAC	1080
E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	
AGC	ACG	TAC	CGT	GTG	GTC	AGC	GTC	CTC	ACC	GTG	CTG	CAC	CAG	GAC	1125
S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	
TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG	TGC	AAG	GTG	TCC	AAC	AAA	GCC	1170
W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	
CTC	CCA	GTC	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	CAG	1215
L	P	V	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	
CCC	CGA	GAA	CCA	CAG	GTG	TAC	ACC	GTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAG	GAG	1260
P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	
ATG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	1305
M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	
TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	1350
Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	
GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	GGC	1395
E	N	N	Y	K	T	T	P	V	L	D	S	D	G	G	
TCC	TTG	TTG	CTC	TAT	AGC	AAG	CTC	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	1440
S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	
CAG	Q	G	GGG	AAC	GTC	TTG	TCA	TGC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	CTG	1485
Q	G	N	V	V	TTG	TCA	TGC	TCC	S	V	M	H	E	A	
CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCC	CCG	GGT	AAA	1530
H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K	

FIGURA 21



FIGURA 22

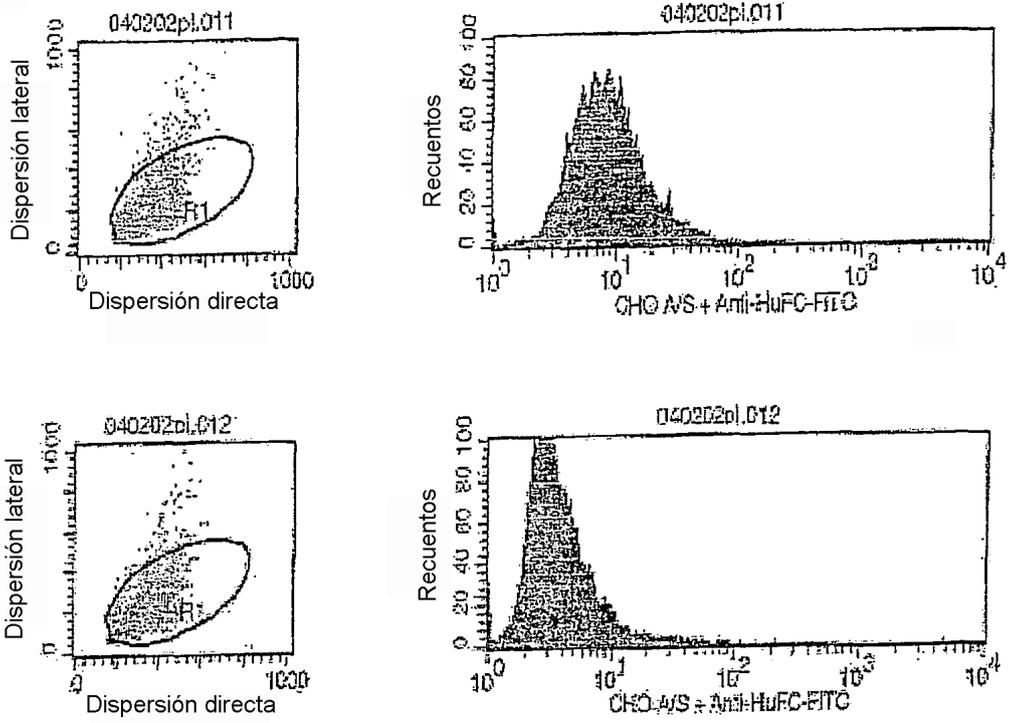


FIGURA 23

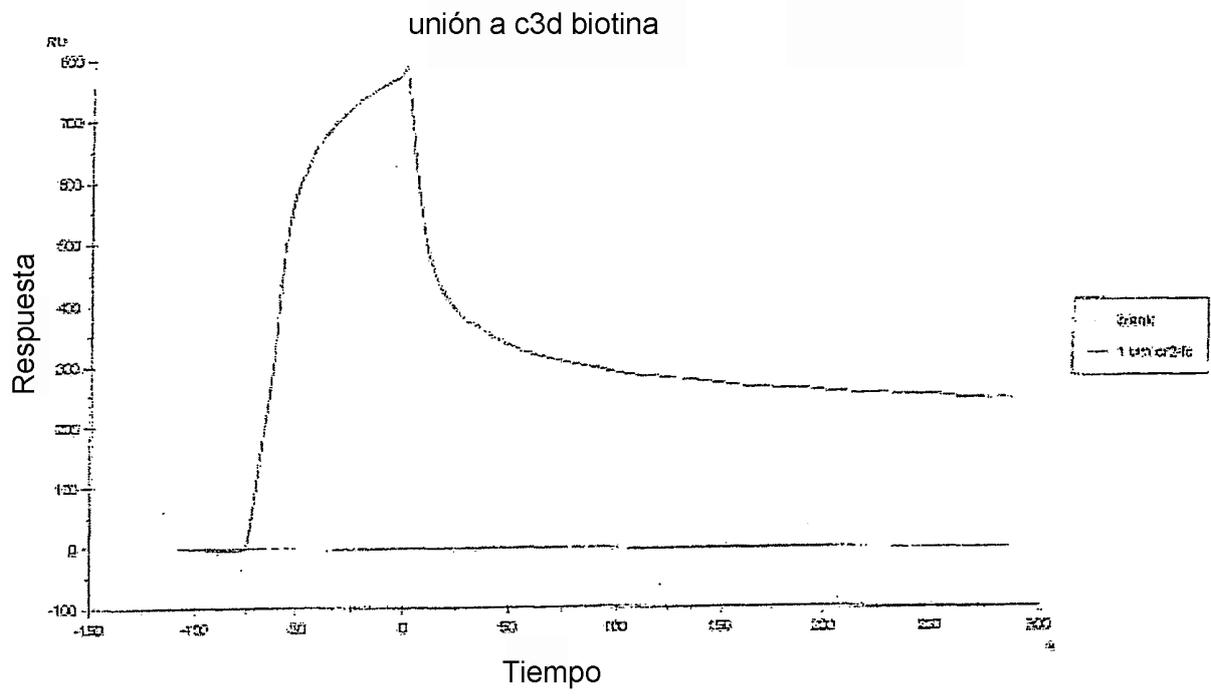


FIGURA 24

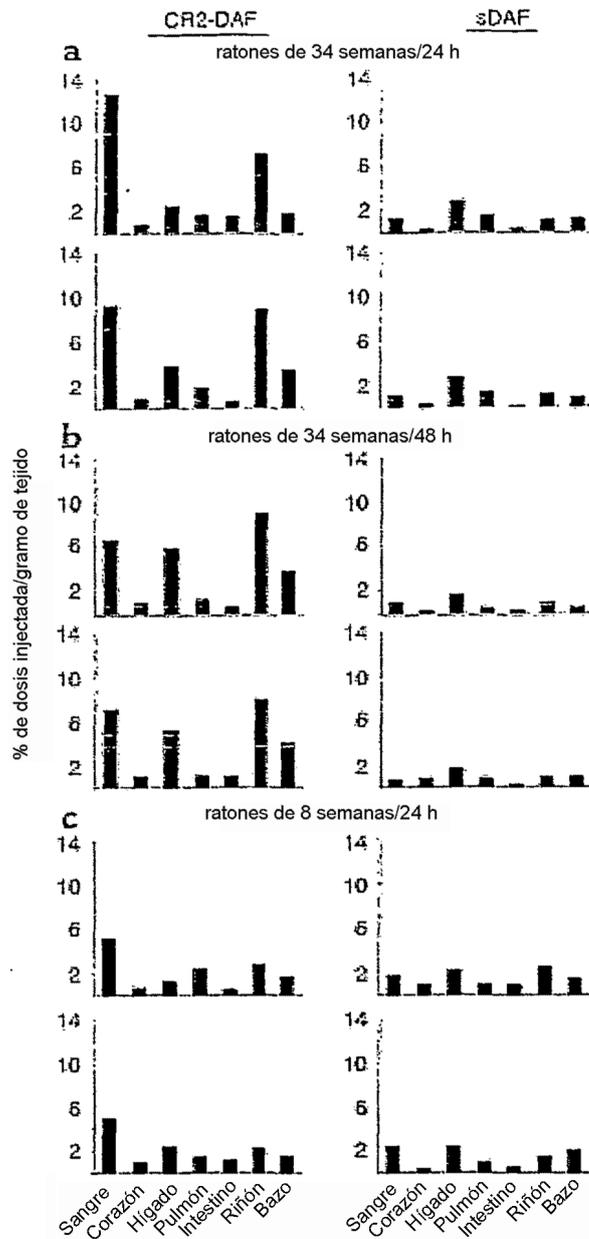


FIGURA 25

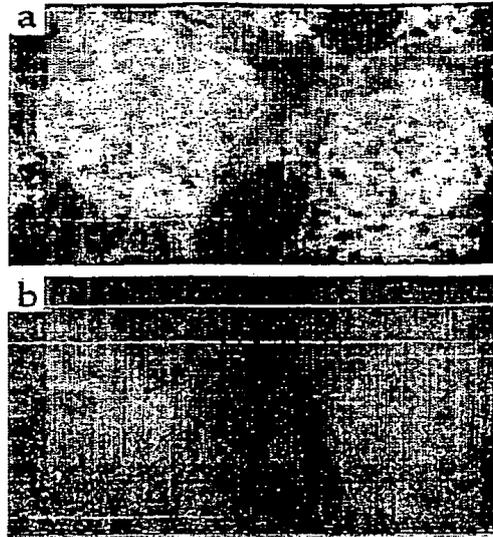


FIGURA 26

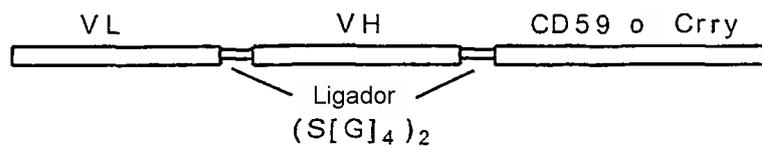


FIGURA 27

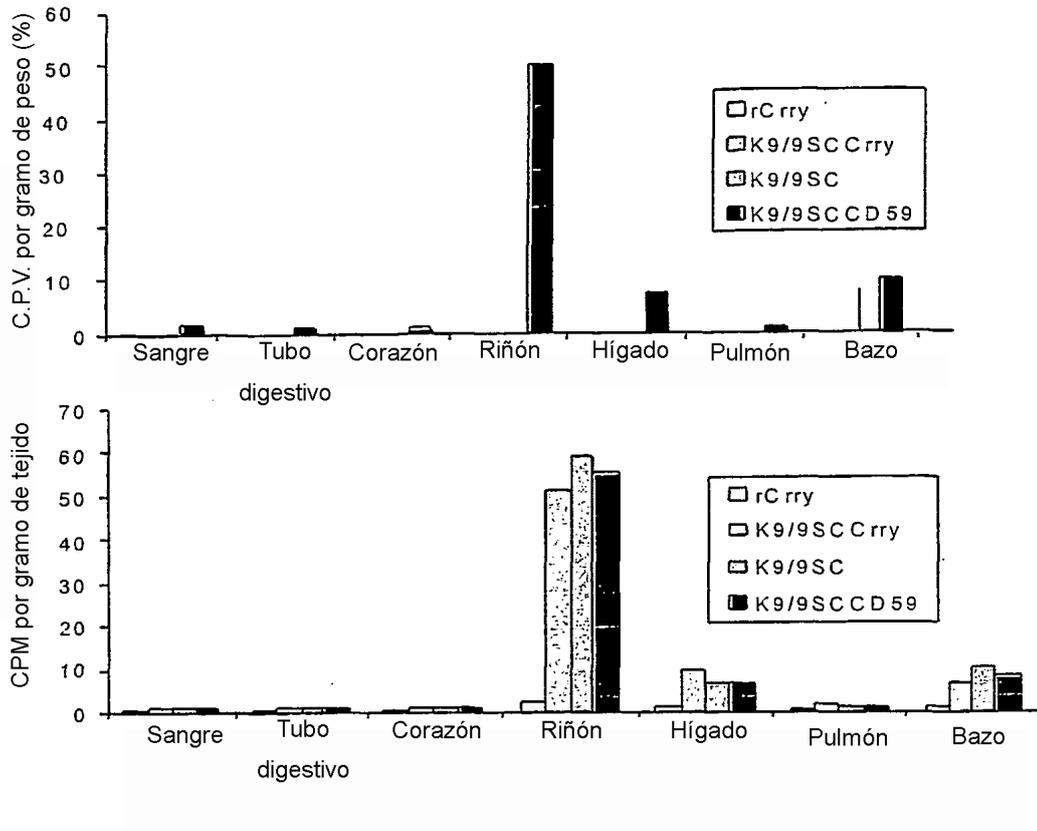


FIGURA 28

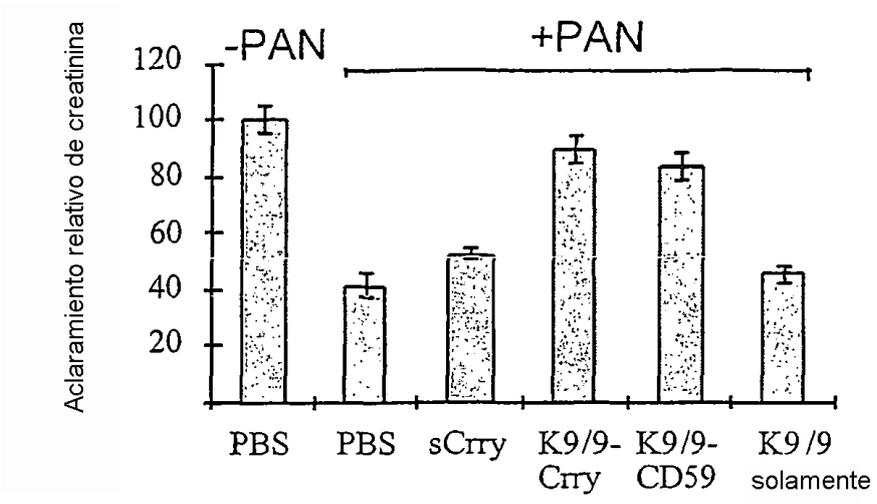


FIGURA 29

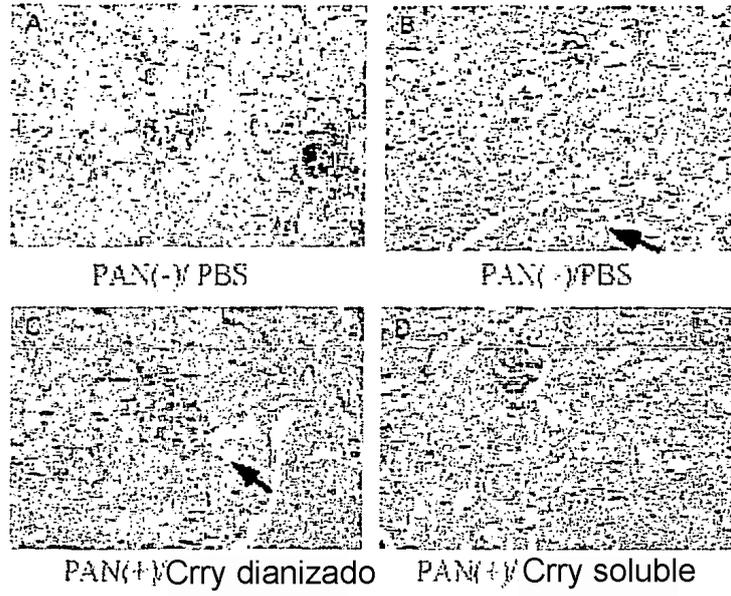


FIGURA 30

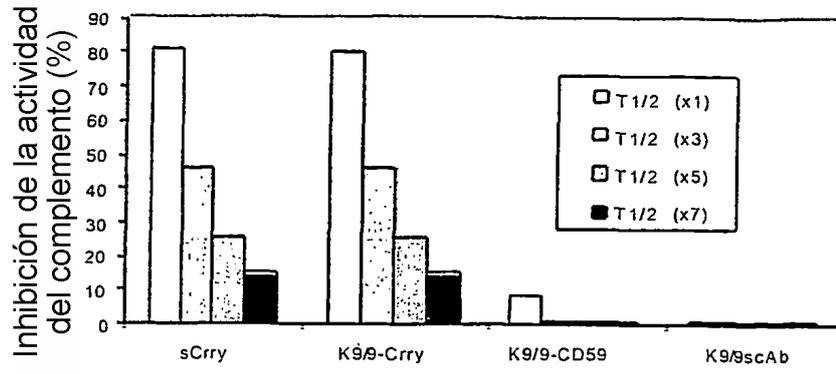


FIGURA 31