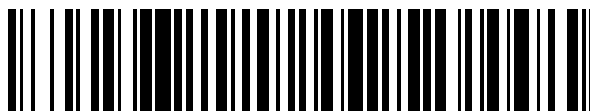


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 194**

51 Int. Cl.:

C07K 14/095 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2006** **E 06844159 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013** **EP 1922329**

54 Título: **Proteínas quiméricas del receptor de toxina mejoradas y proteínas quiméricas del receptor de toxina para el tratamiento y la prevención de anthrax**

30 Prioridad:

02.08.2005 US 704829 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.10.2013

73 Titular/es:

PLANET BIOTECHNOLOGY, INC. (100.0%)
25571 CLAWITER ROAD
HAYWARD, CA 94545, US

72 Inventor/es:

YU, LLOYD, M.;
WYCOFF, KEITH, L. y
LARRICK, JAMES, W.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 426 194 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).

5

DESCRIPCIÓN

Proteínas quiméricas del receptor de toxina mejoradas y proteínas quiméricas del receptor de toxina para el tratamiento y la prevención de anthrax

La presente invención se refiere a proteínas quiméricas del receptor de toxina, las inmunoadhesinas, su producción a partir de plantas, y su uso en el tratamiento y la prevención de la toxicidad y las enfermedades causadas por agentes patógenos.

Los receptores solubles y las proteínas de unión, que actúan como señuelo para toxinas y agentes patógenos y que mitigan la infección y la patogénesis, abren las puertas a la esperanza en el tratamiento y la prevención de la toxicidad y de enfermedades causadas por agentes patógenos.

Un ejemplo de una condición tratable con un receptor señuelo es la infección por carbunco. Se han identificado dos receptores de membrana del PA (antígeno protector, un componente tóxico del carbunco): el marcador endotelial tumoral 8 (TEM8) y la proteína de morfogenia capilar 2 (CMG2) (30,31). Se ha mostrado que las formas solubles de dominios extracelulares de ambas proteínas inhiben la intoxicación de células con receptores endógenos de toxina. La forma soluble de TEM8 inhibió la acción de la toxina letal en un 50% a 80 nM (IC₅₀ = 80 nM) (Bradley, K. A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R. J. & Young, J. A. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 414,225-9 (2001)). La proteína CMG2 mostró una afinidad con el PA de 170 pM, y un IC₅₀ en el ensayo de protección macrófaga de 3,1 nM (67 ng/ml), convirtiéndose así en un potente inhibidor potencial de la acción de la toxina del carbunco (Scobie, H. M., Rainey, G. J., Bradley, K. A. & Young, J. A. Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 5170-4 (2003); Wigelsworth, D. J., Krantz, B. A., Christensen, K. A., Lacy, D. B., Juris, S. J. & Collier, R. J. Binding stoichiometry and kinetics of the interaction of a human anthrax toxin receptor, CMG2, with protective antigen. *J Biol Chem* 279, 23349-56 (2004)). En ensayos de cultivo celular, las formas solubles de CMG2 de dominios extracelulares neutralizaron el 50% de la actividad de la toxina letal en una proporción molar de 3:1 con el PA (Scobie et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 5170-4 (2003)). Sin embargo, la alta concentración de bacilos en sangre durante una infección activa sugiere que la concentración del PA puede ser bastante alta, y que se necesita una dosis alta de antitoxina para dar protección.

WO 03/064992 (PLANET) describe un complejo inmunoglobulínico quimérico de receptor de la toxina del carbunco que comprende una porción de cadena pesada de inmunoglobulina y una porción de cadena ligera de inmunoglobulina.

Para minimizar la cantidad de proteína de receptor señuelo necesaria para asegurar la eficacia, sería conveniente incrementar la actividad específica o la potencia del receptor señuelo aún más. Por lo tanto, siguen siendo necesarios potentes señuelos con mayor actividad y mayor farmacocinética.

El receptor señuelo descrito en el presente documento tiene varios inconvenientes, como son laboriosas técnicas de producción y costes altos asociados a los métodos de producción. Además, estos receptores señuelo tienen una estabilidad limitada como multímeros en condiciones ambientales adversas en las que la molécula puede incluso inactivar los patógenos. Así pues, es necesario desarrollar tecnologías de señuelo con una mayor estabilidad para mejorar el rendimiento y que se pueda producir en volúmenes comercialmente viables a un coste razonable.

La invención aporta una proteína quimérica de receptor tal y como se indica en cualquiera de las peticiones de 1 a 9.

En realizaciones preferidas, las proteínas quiméricas de receptor de toxina se expresan en plantas, incluyendo plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas como parte del genoma de las plantas. El tabaco es una de las plantas preferidas para ello. La expresión en plantas, en contraposición a la expresión en células de mamífero cultivadas, favorece una importante reducción del coste de producción de las proteínas quiméricas de receptor de toxina.

En una realización preferida, todas las proteínas utilizadas para crear la toxina quimérica son proteínas de receptor expresadas en células heterólogas obtenidas a partir de plantas, vertebrados o invertebrados, como células de mamíferos, células del folículo piloso o células de tejidos vegetales cultivados.

En este documento se describen inmunoadhesinas que contienen receptores quiméricos de toxina. En algunas realizaciones, la inmunoadhesina es un multímero que contiene al menos dos proteínas quiméricas de receptor de toxina. En otras realizaciones, la inmunoadhesina incluye una proteína de receptor de toxina asociada a la cadena J. En otra realización, la composición de la inmunoadhesina unida a la cadena J se asocia a un componente secretor.

En una realización, la presente invención contempla una proteína quimérica de receptor de toxina que tiene una glicosilación específica de planta. Un gen que codifica un polipéptido que contiene en su secuencia de aminoácidos la señal de glicosilación asparagina-X-serina/treonina, en la que X puede ser cualquier resto de aminoácido, se glicosila mediante oligosacáridos unidos al residuo asparagina de la secuencia cuando se expresa en una célula de planta. Ver Marshall, Ann. Rev Biochem., 41:673 (1972) y Marshall, Biochem. Soc. Symp., 40:17 (1974) para una revisión general de la secuencia de polipéptidos que funcionan como señales de glicosilación. Estas señales son reconocidas por células tanto de mamífero como de planta. Al final de su maduración, las proteínas expresadas en plantas o en células vegetales tienen un modelo de glicosilación diferente al de las proteínas expresadas en otros

5 tipos de células entre las que se incluyen células de mamíferos e insectos. Estudios detallados que caracterizan la glicosilación específica de plantas y su comparación con la glicosilación en otros tipos celulares se han realizado, por ejemplo, en los estudios descritos por Cabanes-Macheteau et al., *Glicobiología* 9(4):365-372 (1999), y por Altmann, *Glicoconjugación J.* 14:643-646 (1997). Estos y otros grupos han demostrado que la glicosilación específica de plantas genera glicanos que tienen xilosa unida por enlaces $\beta(1,2)$ a la manosa, pero la xilosa no está
 10 unida por enlaces $\beta(1,2)$ a la manosa como resultado de la glicosilación en células de mamífero e insecto. La glicosilación específica de plantas da como resultado una fucosa unida por enlaces $\alpha(1,3)$ al GlcNAc proximal, mientras que la glicosilación en células de mamífero da como resultado una fucosa unida por enlaces $\alpha(1,6)$ al GlcNAc proximal. Adicionalmente, la glicosilación específica de plantas no da como resultado la adición de un ácido siálico al extremo de la proteína de glicano, mientras que en la glicosilación en células de mamífero se añade ácido
 15 siálico.

En otra realización, las composiciones anteriores son además asociadas con material de planta. El material de planta presente puede ser paredes celulares vegetales, orgánulos vegetales, citoplasmas vegetales, células vegetales intactas, semillas vegetales, plantas viables y similares. Los materiales vegetales o macromoléculas vegetales particulares que pueden estar presentes incluyen ribulosa bífosfato carboxilasa, complejo ligero de cultivo, pigmentos, metabolitos secundarios o clorofila y sus fragmentos. Las composiciones de la presente
 20 invención pueden tener una concentración de proteína quimérica de receptor de toxina de entre 0,001% y 99,9% en masa, excluyendo el agua. En otras realizaciones, la proteína quimérica de receptor de toxina está presente en concentraciones de entre 0,01% y 99% en masa, excluyendo el agua. En otras realizaciones, las composiciones de la presente invención tienen material de planta o macromoléculas vegetales presentes a una concentración de
 25 0,01% a 99% en masa, excluyendo el agua.

En otra realización, la invención proporciona métodos para reducir el potencial de unión con un antígeno patógeno tal como se establece en la reivindicación 12. La invención contempla un receptor quimérico de toxina definido para su uso como medicamento en pacientes o animales.

La invención incluye además una proteína quimérica de receptor de toxina para su uso anteriormente indicado en la
 30 prevención o el tratamiento de la infección por carbunco, o los efectos de la toxina del carbunco.

En otro aspecto, la invención aporta compuestos farmacéuticos que incluyen las proteínas quiméricas de receptor de toxina aquí descritas y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector de expresión que codifica la proteína quimérica de receptor de toxina CMG2 tal y como se describe en este documento.

35 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para producir una proteína quimérica de receptor de toxina tal y como se indica en las reivindicaciones 16 o 17.

También se contemplan alteraciones y modificaciones de la proteína de receptor o una parte de la misma, teniendo en cuenta que dichas modificaciones no destruyen la capacidad del receptor de unirse a la toxina, la sustancia tóxica, el patógeno o el componente patogénico.

40 Como se ha indicado anteriormente, las proteínas quiméricas de receptor de toxina de carbunco de la invención se pueden expresar en plantas y en diversas células heterólogas. En una realización preferida, todas las proteínas utilizadas para producir las proteínas quiméricas de receptor de toxina de la presente invención son proteínas humanas.

45 En otro aspecto, la invención proporciona inmunoadhesinas que incluyen los receptores quiméricos de la toxina del carbunco aquí descritos, como por ejemplo, multímeros con al menos dos proteínas quiméricas del receptor de la toxina del carbunco, la proteína quimérica del receptor de la toxina del carbunco asociada a la cadena J, y la proteína quimérica del receptor de la toxina del carbunco asociada a la cadena J y al componente secretor.

En otras realizaciones, la presente invención contempla una proteína quimérica de receptor de toxina de carbunco con glicosilación específica de plantas y las composiciones anteriores asociadas además a material de planta.

50 También se describe en el presente documento la reducción o prevención de la unión del antígeno protector (PA) de *Bacillus anthracis* con células huésped por contacto del PA con los receptores quiméricos de toxina de carbunco aquí descritos. Otros aspectos caracterizan los métodos para la reducción de la morbilidad y mortalidad del carbunco y la morbilidad y mortalidad debido al antígeno protector.

55 En otros aspectos, la invención proporciona compuestos farmacéuticos como receptores quiméricos de la toxina de carbunco, vectores de expresión para dichos receptores y métodos de elaboración de dichos receptores.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra pSSPHuA2, vector en el que se han fusionado los ADN que codifican una molécula quimérica de ICAM-1 que contiene las primeras cinco regiones de la ICAM-1 humana y la región Fc de la IgA2m(2) humana [SEC

ID N.º: 9,48]. Este vector contiene el promotor SuperMas para impulsar la expresión de un péptido señal y las regiones constantes de la cadena pesada de la IgA2m(2) humana. Las secuencias que codifican las regiones 1-5 de ICAM se amplificaron, mediante RCP, para contener emplazamientos de restricción convenientes (5' SpeI y 3' SpeI) para la inserción entre el péptido señal y la región Cα1. Se añadió ADN que codifica una señal de retención ER (RSEKDEL) [SEC ID N.º: 5] al extremo 3' de la cadena pesada con el fin de impulsar el nivel de expresión del constructo.

La FIG. 2 muestra una molécula quimérica de ICAM. 2A muestra el casete de expresión de ADN a partir del cual se ha producido la molécula quimérica de ICAM-1. 2B muestra la secuencia de aminoácidos, tras la escisión del péptido señal, de la forma madura de la proteína de fusión [SEC ID N.º: 8]. Los aminoácidos introducidos mediante el procedimiento de clonación están subrayados y marcan la unión entre los cinco dominios extracelulares de ICAM-1 y las regiones Cal-Cα3 de la cadena pesada de la IgA2m(2). Los números en negrita indican los quince posibles puntos de glicosilación.

La FIG. 3 muestra la expresión de la inmunoadhesina en callo de tabaco transformado de forma independiente. 3A muestra inmunoblots de geles no reductores de SDS-PAGE con muestras que contienen diferentes callos de tabaco transformados (C) y extractos acuosos (Aq) probados y sondeados para la presencia de ICAM humana.

Los marcadores de peso molecular están indicados, y el patrón de referencia (R) fue una mezcla (~75 ng de cada) de ICAM humana (~75 kD) y SIgA humana (>>250 kD). 3B muestra inmunoblots de geles no reductores de SDS-PAGE que contienen diferentes fracciones de inmunoadhesina parcialmente purificada procedente del callo Rhi107-11. Las fracciones analizadas de la purificación fueron jugo (3), fracción G-100 (G), fracción G-100 esterilizada por filtración (SG), y una mezcla de patrones de referencia de SIgA humana (75 ng) (RS). Las transferencias se sondearon con anticuerpos frente a la ICAM humana (~ICAM), cadena pesada de la IgA humana (~α), componente secretor humano (~SC) y cadena J humana (~J). En segundo lugar, se usaron anticuerpos conjugados con enzimas según necesidad para etiquetar las bandas inmunopositivas con fosfatasa alcalina.

La FIG. 4 ilustra los resultados de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) mostrando la competición entre el extracto de planta y la ICAM-1 soluble por la unión a un mAb anti-ICAM. Para el ensayo, se revistieron placas de 96 pocillos con 0,25 µg/ml de ICAM-1 soluble. Los cuadrados representan la concentración creciente de sICAM y los círculos representan las cantidades crecientes de extracto de callo (fracción G-100 esterilizada por filtración) usada para competir con la ICAM adherida para una cantidad constante de un anticuerpo murino (ICAM anti-humano).

La FIG. 5 ilustra los resultados de un ensayo que muestra la capacidad de una inmunoadhesina para inhibir el rinovirus humano causando la muerte a las células HeLa (ensayo de efecto citopático o ECP). 5A muestra los resultados de un ensayo que compara ECP de rinovirus humano sobre células HeLa en presencia de extractos parcialmente purificados que contienen bien la inmunoadhesina de la fusión ICAM-Fc (IC1-5D/IgA) o que contienen un anticuerpo frente a doxorubicina. (Los triángulos hacia arriba y hacia abajo representan dos extractos derivados de Rhi107-11, que contienen inmunoadhesina.) 5B muestra los resultados de un ensayo que compara ECP de rinovirus humano sobre células HeLa en presencia de ICAM-1 soluble humana o de un extracto procedente de la inmunoadhesina de la fusión ICAM-Fc (IC1-5D/IgA). La parte inferior muestra la ampliación de la escala en el intervalo de la IC50 de la ICAM soluble (1,35 µg/ml) y para IC1-5D/IgA (0,12 µg/ml; 11,3 veces menos).

La FIG. 6 muestra una evaluación de las necesidades de producción para fabricar 1 g de inmunoadhesina terminada. En este diagrama, se ilustra el número de plantas necesarias para 1 g de inmunoadhesina, con un rendimiento del 20%, con los niveles de expresión esperados y el peso de plantas. A diferentes niveles de expresión de inmunoadhesina (mg/kg de peso fresco) y una recuperación global (ajustada al 20%), se puede determinar el peso de cada planta, y de esta manera el número total de plantas para un objetivo de producción específico (1 g/cosecha) contenido en una ventana (cuadro punteado) de posibilidades razonables. El número de plantas necesarias disminuye, inversamente, con el número especificado de periodos de crecimiento y recrecimiento. La producción esperada de biomasa, que es función del tiempo y de las condiciones de crecimiento, influye sobre el momento de cosechar y el periodo entre cosechas. Estos periodos de crecimiento se pueden ajustar a las realidades del programa de purificación espaciando las fechas de plantación y cosechado.

La FIG. 7 muestra la codificación y la secuencia de los aminoácidos de cada uno de los genes y proteínas de inmunoglobulina relacionados en la Tabla 2. [SEC ID N.º: 15 a 47 y SEC ID N.º: 52 a 62].

La FIG. 8 muestra las secuencias de plásmidos usados para transformar plantas, según se describe en el ejemplo 2, para uso en los estudios de la expresión de inmunoadhesinas de la presente invención.

La FIG. 8A muestra las secuencias de nucleótidos [SEC ID N.º: 9] y proteínas [SEC ID N.º: 48] de los plásmidos PSSpICAMHuA2.

La FIG. 8B muestra las secuencias de nucleótidos y proteínas [SEC ID N.º: 10] del péptido señal de legúmina de alubia.

- 5 La FIG. 8C muestra las secuencias de nucleótidos [SEC ID N.º: 11] y aminoácidos [SEC ID N.º: 50] del dominio de codificación de proteína de pSHuJ.
- La FIG. 8D muestra las secuencias de nucleótidos [SEC ID N.º: 12] y aminoácidos [SEC ID N.º: 51] del dominio de codificación de proteína de pSHuSC.
- La FIG. 8E muestra la secuencia de nucleótidos [SEC ID N.º: 13] de los plásmidos pBMSP-1.
- 10 La FIG. 8F muestra la secuencia de nucleótidos [SEC ID N.º: 14] de los plásmidos pBMSP-1spJSC.
- La FIG. 9 contiene las secuencias de nucleótidos y proteínas SEC ID N.º: 1; SEC ID N.º: 2; SEC ID N.º: 3; SEC ID N.º: 4; SEC ID N.º: 5; SEC ID N.º: 6; SEC ID N.º: 7; SEC ID N.º: 8, para ICAM-1, IgA2 humana y otras secuencias de nucleótidos.
- La FIG. 10 muestra secuencia completa (SEC ID N.º: 98] de nucleótidos y aminoácidos (SEC ID N.º: 99) de la fusión de ATR-IgA2 (inmunoadhesina).
- 15 La FIG. 11 muestra la secuencia (SEC ID N.º: 100) entre los extremos del ADN-T del plásmido pGPTV-kan-ocs-ATR-IgA2.
- La FIG. 12 muestra la secuencia (SEC ID N.º: 101) entre los extremos del ADN-T del plásmido pGPTV-hpt-ocs-35SJ/SC.
- 20 La FIG. 13 muestra un ensayo de efecto citopático. ICAM-I/IgA2 (rombos) e ICAM-1 soluble (cuadrados) mezcladas en distintas concentraciones con rinovirus humano y, a continuación, se agregaron a células HeLa. La inhibición de la muerte celular se cuantificó a los 4 días.
- La FIG. 14 muestra la secuencia de aminoácidos del constructo CMG2-IgG y variantes. La cisteína en negrita (Cys185 de la secuencia anterior, y Cys218 de la secuencia publicada³¹) es el último aminoácido del dominio VWA/I.
- 25 Los siguientes 14 aminoácidos (en cursiva) son parte de CMG2, pero no del dominio VWA/I. Las etiquetas encima de la secuencia indican los inicios de IgG1 Cy1, Cy2 y Cy3. La secuencia subrayada es la región bisagra IgG1. Las secuencias de variantes (V1, V2a, V2b y V3) están indicadas con guiones que representan los aminoácidos suprimidos. Los números sobre los aminoácidos en negrita indican los extremos amino-terminales de los segmentos fragmentados (descritos en el texto).
- 30 La FIG. 15 es un gel de tinción plateada de proteína A purificada CMG2-IgG y 1H IgG. Las bandas 1 y 4, patrones de tamaño de proteína; la banda 2; CMG2-IgG reducida; la banda 3, 1H reducida; las bandas 5 y 6, CMG2-IgG no reducida de dos preparaciones separadas; la banda 7, 1H no reducida. Las muestras de proteína recombinante contienen 50 ng de proteína por banda. Representación en dibujo de inmunoadhesinas CMG2-IgG y posibles productos de degradación mostrados en la zona de la derecha.
- 35 La FIG. 16 es una tinción con Coomassie SDS-PAGE de CMG2-IgG y variantes. Las bandas 1-7 migran bajo condiciones no reductoras. Las bandas 8-13 migran bajo condiciones reductoras (100 mM DTT). Las bandas 1 y 8, original CMG2-IgG; las bandas 2 y 9, V1; las bandas 3 y 10, V2a; las bandas 4 y 11, V2b; las bandas 5 y 12, V3; las bandas 6 y 13, CMG2-IgG + cadena kappa; la banda 7, marcadores de peso molecular.
- La FIG. 17 es un perfil de elución del CMG2-IgG V2b derivado de planta, fraccionado mediante cromatografía por exclusión de tamaño. La proteína A-purificada CMG2-IgG V2b procedente de la planta de tabaco se introdujo en una columna Tosoh G4000SW y se eluyó con PBS. Se monitorizó la proteína a una absorbancia de 280 nm. Se había calibrado la columna a los estándares de peso molecular antes de la ejecución. Los tiempos de retención y los pesos moleculares calculados se indican en los perfiles. El patrón interno ácido p-aminobenzoico (pico con un tiempo de retención de 15,3 minutos) se añadió a la muestra antes de la separación.
- 40 La FIG. 18 muestra la neutralización de la citotoxicidad de la toxina letal gracias a variantes de CMG2-IgG. RAW 264.7 células macrófagas de ratón se expusieron al PA + LF a concentraciones en aumento (0 a 1,25 µg/ml) de cualquiera de los originales CMG2-IgG (cuadrados), CMG2-IgG V2b (rombos), o una irrelevante IgG de planta (círculos). Cada punto es el promedio de tres repeticiones.
- La FIG. 19 es un modelo de CMG2-IgG V2b. Representación hipotética de un homodímero de la antitoxina, unido a una molécula de PA. La antitoxina se representa como la unión mediante interacciones no-covalentes entre los dominios Cy3, aunque puede haber un puente disulfuro en la región bisagra (entre CMG2 y Cy2) en una fracción de las moléculas. La barra indica la escala. Los archivos de estructura provienen de la base de datos de proteínas, y las imágenes de los gráficos moleculares se hicieron utilizando los medios de UCSF Chimera, de Recursos de Bioinformática, Visualización e Informática de la Universidad de California, San Francisco (con apoyo de NIH P41 RR-01081).⁵⁴
- 55 La FIG. 20 muestra variantes de CMG2-kappa. La CMG2-kappa se expresó en *N. benthamiana* tanto con CMG2-IgG V1 como con CMG2-IgG V3 y las proteínas purificadas por la proteína A se sometieron a SDS-PAGE y fueron

- 5 teñidas con Coomassie. Las bandas 1 y 2 migraron bajo condiciones no reductoras. Las bandas 3 y 4 migraron bajo condiciones reductoras (100 mM DTT); la banda 5 corresponde a los marcadores de peso molecular.

Breve descripción de las tablas

La tabla 1 muestra las fronteras de los cinco dominios extracelulares de ICAM-1.

- 10 La tabla 2 muestra los números de acceso a la secuencia de GenBank para los genes de la cadena pesada de inmunoglobulina y las proteínas codificadas por esos genes.

La tabla 3 proporciona una lista de ejemplos de moléculas que muestran homología con ICAM-1 y que se pueden utilizar para crear otras proteínas quiméricas de receptor de toxina rinovirus.

La tabla 4 muestra los conocidos receptores de la botulina y los dominios de unión putativos.

- 15 La tabla 5 muestra el diseño del estudio para los estudios de provocación con rinovirus al azar llevados a cabo en el ejemplo 9.

La tabla 6 muestra la producción del receptor quimérico de toxina de carbunco por transfección continuada de hojas de *N. benthamina* tal y como se describe en el ejemplo 16.

La tabla 7 muestra la IC₅₀ calculada y la proporción de concentración molar de la antitoxina al PA a la IC₅₀ para el ejemplo 18.

- 20 La tabla 8 describe la estructura de diversas variantes quimérica de CMG-IgG en el ejemplo 19.

Descripción detallada

Definiciones

Según se usan en el presente documento, las siguientes abreviaturas y términos incluyen, pero no necesariamente se limitan a, las siguientes definiciones.

- 25 La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están entre las habilidades de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (1989); *Current Protocols In Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., (1987)); la serie *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc.); M.J. MacPherson, et al. eds. *Pcr 2: A Practical Approach* (1995); Harlow y Lane, eds, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988), y H. Jones, *Methods In Molecular Biology* vol. 49, «Plant Gene Transfer And Expression Protocols» (1995).
- 30

Inmunoadhesina: un complejo que contiene una molécula proteínica quimérica de receptor de toxina unido a una parte del dominio constante de la inmunoglobulina, y que en algún caso contiene componente secretor y cadena J.

- 35 Proteína quimérica de receptor de toxina: una proteína de un receptor de toxina que contiene al menos una parte de su secuencia de aminoácidos derivada del receptor de toxina y al menos una parte deriva de un complejo inmunoglobulínico.

- 40 Receptor de toxina: tal y como se usa en este documento, el término se refiere a cualquier polipéptido que se une a agentes patógenos como se define en el presente documento, toxinas o cualquier proteína, lipoproteínas, glicoproteínas, polisacáridos o lipopolisacáridos que provoquen o ayuden a provocar un efecto patogénico con suficiente afinidad y avidez para permitir que la proteína quimérica de receptor de toxina actúe como receptor señuelo. Por ejemplo, un receptor de toxina puede ser un receptor viral adjunto como ICAM-1, un receptor del rinovirus humano, o un receptor de una toxina bacteriana, como uno de los receptores de antígeno protector del carbunco o de la toxina botulínica. Los receptores de toxina, tal y como se usan aquí, deben contener como mínimo los elementos funcionales para unirse a los componentes tóxicos/patógenos pero pueden incluso tener uno o más
- 45 polipéptidos adicionales.

- Molécula de inmunoglobulina o anticuerpo: un polipéptido o proteína multimérica que contiene las porciones inmunológicamente activas de una cadena pesada de la inmunoglobulina y de una cadena ligera de la inmunoglobulina covalentemente emparejadas entre sí y capaces de combinarse específicamente con un antígeno. Las inmunoglobulinas o moléculas de anticuerpo son una gran familia de moléculas que incluye varios tipos de moléculas tales como IgM, IgD, IgG, IgA, IgA secretora (SIgA) e IgE.
- 50

Complejo inmunoglobulínico: un complejo polipeptídico que puede incluir una porción de una cadena pesada de inmunoglobulina o tanto una porción de cadena pesada de inmunoglobulina como una cadena ligera de inmunoglobulina. Los dos componentes se pueden asociar entre sí de varios modos, como por ejemplo por enlaces covalentes como puentes disulfuro.

- 5 Porción de una cadena pesada de inmunoglobulina: tal y como se usa en este documento, el término se refiere a aquella región de una cadena pesada que necesariamente aporta al menos una de las siguientes propiedades a las proteínas quiméricas de receptor de toxina tal y como aquí se describe: capacidad de multimerización, funciones efectoras, capacidad de ser purificada por las proteínas G o A, o mejorar la farmacocinética. Normalmente, esto incluye por lo menos una parte de la región constante.
- 10 Porción de una cadena ligera de inmunoglobulina: tal y como se usa en este documento, el término se refiere a aquella región de una cadena ligera necesaria para mejorar la estabilidad de la descrita proteína quimérica de receptor de toxina y, por tanto, mejorar la producción. Normalmente, esto incluye por lo menos una parte de la región constante.
- 15 Dominio constante de la cadena pesada: un polipéptido que contiene al menos una porción del dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina. Normalmente, en su forma original, la cadena pesada de inmunoglobulina IgG, IgD e IgA contiene tres dominios constantes unidos a un dominio variable. IgM e IgE contienen cuatro dominios constantes unidos a un dominio variable. Tal y como se usa en este documento, los dominios constantes se numeran de manera secuencial desde la región proximal al dominio variable. Por ejemplo, en las cadenas pesadas de IgG, IgD e IgA, el nombre dado a los dominios es: dominio variable, dominio constante 1, dominio constante 2 y dominio constante 3. En el caso de IgM e IgE, el nombre dado a los dominios es: dominio variable, dominio constante 1, dominio constante 2, dominio constante 3 y dominio constante 4.
- 20 Cadena pesada de inmunoglobulina quimérica: una cadena pesada derivada de la inmunoglobulina que contiene al menos una porción de su secuencia de aminoácidos derivada de una cadena pesada de inmunoglobulina de distinto isotipo o subtipo o algún otro péptido, polipéptido o proteína. Normalmente, una cadena pesada de inmunoglobulina quimérica muestra su secuencia residual de aminoácidos derivada de al menos dos isotipos o subtipos de cadena pesada de inmunoglobulina diferentes.
- 25 Cadena J: un polipéptido que está implicado en la polimerización de inmunoglobulinas y en el transporte de las inmunoglobulinas polimerizadas a través de las células epiteliales. Véase The Immunoglobulin Helper: The J Chain in Immunoglobulin Genes, p. 345, Academic Press (1989). La cadena J se encuentra en la IgM pentamérica y en la IgA dimérica y normalmente va unida mediante puentes disulfuro. La cadena J se ha estudiado tanto en ratones como en humanos.
- 30 Componente secretor (SC): un componente de inmunoglobulinas secretoras que ayuda a proteger la inmunoglobulina de agentes inactivantes incrementando de esta manera la eficacia biológica de la inmunoglobulina secretora. El componente secretor puede proceder de cualquier mamífero o roedor incluyendo el ratón y el ser humano.
- 35 Unión: tal como se usa en el presente documento, el término se refiere a cualquier secuencia de polipéptidos utilizada para facilitar el plegado y la estabilidad de un polipéptido recombinante. Preferiblemente, esta unión será flexible, por ejemplo, una compuesta por una secuencia polipeptídica como (Gly3Ser)3 o (Gly4Ser)3.
- 40 Planta transgénica: planta diseñada por ingeniería genética o progenie de plantas diseñadas por ingeniería genética. La planta transgénica contiene normalmente material procedente de al menos un organismo no relacionado, como un virus, otra planta o un animal.
- Plantas monocotiledóneas: plantas con flores cuyos embriones tienen una hoja o cotiledón en las semillas. Ejemplos de monocotiledóneas son: lirio, césped, maíz, gramíneas, como la avena, el trigo y la cebada, orquídea, iris, cebolla y palmera.
- 45 Plantas dicotiledóneas: plantas con flores cuyos embriones tienen dos hojas o cotiledones en las semillas. Ejemplos de dicotiledóneas son: tabaco, tomate, legumbres como la alfalfa, roble, arce, rosa, menta, calabaza, margarita, nogal, cactus, violeta y ranúnculo.
- 50 Glicosilación: La modificación de una proteína mediante oligosacáridos. Véase Marshall, Ann. Rev. Biochem., 41:673 (1972) y Marshall, Biochem. Soc. Symp., 40:17 (1974) para una revisión general de las secuencias de polipéptido que funcionan como señales de glicosilación. Estas señales son reconocidas por células tanto de mamífero como de planta.
- 55 Glicosilación específica de plantas: el modelo de glicosilación encontrado en las proteínas expresadas en plantas y que es distinto del encontrado en las proteínas fabricadas en células de mamífero o de insecto. Las proteínas expresadas en plantas o en células vegetales tienen un modelo de glicosilación diferente al de las proteínas expresadas en otros tipos de células entre las que se incluyen células de mamífero y células de insecto. Estudios detallados que caracterizan la glicosilación específica de plantas y su comparación con la glicosilación en otros tipos celulares han sido realizados por Cabanes-Macheteau et al., Glycobiology 9(4):365-372 (1999), Lerouge et al., Plant Molecular Biology 38:31-48 (1998) y Altmann, Glycoconjugate J. 14:643-646 (1997). La glicosilación específica de plantas genera glicanos que tienen xilosa β (1,2) a manosa. Ni la glicosilación en mamíferos ni en insectos genera xilosa β (1,2) a manosa. Las plantas no tienen un ácido siálico unido al extremo del glicano, mientras que las células de mamífero sí lo tienen. Además, la glicosilación específica de plantas da como resultado una fucosa α (1,3) al
- 60

- 5 GlcNAc proximal, mientras que la glicosilación en células de mamífero da como resultado una fucosa $\alpha(1,6)$ al GlcNAc proximal.

Antígeno patógeno: cualquier molécula, como por ejemplo, una toxina que provoque o favorezca un efecto patológico. El antígeno patógeno puede o no ser capaz de estimular la formación de anticuerpos.

- 10 Receptor de toxina de carbunco: tal como se usa en el presente documento, el término se refiere a cualquier polipéptido que se una al antígeno protector (PA), uno de los tres componentes proteicos usados por el *Bacillus anthracis* para destruir las células huésped, con suficiente afinidad y avidéz para permitir que la proteína quimérica de receptor de toxina actúe como receptor señuelo. En esta técnica se han identificado dos receptores endógenos de la toxina del carbunco. Receptor de la toxina del carbunco/Marcador tumoral endotelial 8 (ATR/TEM8) (Bradley et al., 2001) y Factor 2 de morfogenia capilar humana (CMG2) (Scobie et al., 2001). El dominio extracelular de estos
- 15 ATR contiene un dominio VWA/I, descrito a continuación. El receptor de toxina del carbunco, tal como se usa en el presente documento, debe tener como mínimo los elementos funcionales para unirse al PA, pero también puede incluir uno o más polipéptidos adicionales (por ejemplo, unos que mejoren el uso del receptor de la toxina del carbunco como receptor señuelo) que se podría generar mediante la fragmentación de las secuencias de codificación en uno o más polipéptidos adicionales dentro de la secuencia de codificación del receptor de la toxina
- 20 del carbunco.

- Dominio VWA/I: tal como se usa en el presente documento, el término se refiere al dominio A del factor de Van Willebrand (dominio VWA), también comúnmente conocido como dominio de la integrina (dominio I), y consiste en un dominio dentro del dominio extracelular de los dos receptores conocidos de la toxina del carbunco, TEM8 y CMG2, y se cree que contiene un sitio de adhesión dependiente de ion metálico (MIDAS) esencial para una correcta
- 25 unión del PA con el receptor.

Proteína quimérica de receptor de la toxina del carbunco: una proteína de un receptor de la toxina del carbunco en la que al menos una parte de su secuencia de aminoácidos deriva del receptor de toxina y al menos una parte deriva de un complejo inmunoglobulínico. El complejo inmunoglobulínico puede contener solo una parte de una cadena pesada de inmunoglobulina o puede contener tanto una parte de cadena pesada como una parte de cadena ligera.

- 30 Receptor de toxina botulínica: cualquier polipéptido que se una a una toxina botulínica con suficiente afinidad y avidéz para permitir que la proteína quimérica del receptor de la toxina del carbunco actúe como receptor señuelo. Entre los ejemplos se incluyen SV2 y sinaptotagmina.

- Cantidad eficaz: una cantidad eficaz de una inmunoadhesina de la presente invención es suficiente para inhibir notablemente una infección viral o bacteriana (según sea el caso), citotoxicidad o replicación; o reducir la gravedad o
- 35 duración de la infección.

- Construido o Vector: un segmento de ADN artificialmente ensamblado para ser transferido a un tejido o célula diana de planta. Normalmente, el constructo incluirá el gen o genes de interés particular, un gen marcador y secuencias de control adecuadas. El término «plásmido» se refiere a una molécula de ADN extracromosómica autónoma y autorreplicante. A los constructos de plásmido que contienen elementos reguladores adecuados se les denomina
- 40 también «casetes de expresión». En una realización preferida, el constructo de plásmido también contiene un marcador seleccionable, por ejemplo un gen de resistencia a los antibióticos.

- Marcador seleccionable: un gen que codifica un producto que permite el crecimiento de tejidos transgénicos en un medio selectivo. Algunos ejemplos de marcadores válidos serían genes que se configuran para mostrar resistencia a los antibióticos, como la ampicilina, la kanamicina o similares. Otros marcadores válidos serán conocidos por las
- 45 personas expertas en la técnica.

Proteínas quiméricas de receptor de toxina con estabilidad mejorada

- Las proteínas quiméricas de receptor de toxina descritas en este documentos tienen un receptor de toxina asociado con un complejo inmunoglobulínico que a su vez tiene una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina. Una proteína de receptor de toxina se puede asociar con una cadena pesada, una cadena
- 50 ligera, o ambas cadenas. En algunas realizaciones, una cadena J, ya sea sola o asociada con un componente secretor, va asociada con una proteína quimérica de receptor de toxina para formar una inmunoadhesina. En otras realizaciones, la proteína quimérica de receptor de toxina tiene una glicosilación específica de planta.

- Sin ánimo de estar forzados por la teoría, se cree que las proteínas quiméricas de receptor de toxina descritas en el presente documento aportan ventajas importantes con respecto a los anticuerpos monoclonales existentes, a los
- 55 usos profilácticos con receptor señuelo o a terapias tales como una actividad más alta debida a la multivalencia del receptor, a funciones efectoras de la inmunoglobulina Fc, la farmacocinética mejorada debido a la Fc, y a la reducción del coste de producción cuando se hace con plantas.

- La ventaja de la multivalencia ha sido demostrada por medio de fusiones de los dominios extracelulares del ICAM-1 humano con las cadenas pesadas de la inmunoglobulina (Martin, S., Casasnovas, J. M., Staunton, D. E. & Springer, T. A. Efficient neutralization and disruption of rhinovirus by chimeric ICAM-1/immunoglobulin molecules. J Virol 67,
- 60

5 3561-8 (1993)). ICAM-1 es el receptor de membrana del rinovirus humano (HRV), un virus del resfriado común. Las inmunoadhesinas quiméricas son mucho más efectivas que el ICAM-1 soluble para inhibir la unión del HRV a las células y alterar la conformación de la cápside viral (Martin et al. J Virol 67, 3561-8 (1993)). Un compuesto ICAM-1/IgA2 (RhinoRx) con más de 10 veces la actividad específica de ICAM-1 soluble en la protección de las células contra el efecto citopático del HRV se ha expresado en tabaco transgénico.

10 La presencia de una región Fc debe conferir funciones efectoras a la inmunoglobulina, tales como la capacidad de producir la lisis de las células en presencia de un complemento. Los dominios de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina confieren varias propiedades conocidas como funciones efectoras del anticuerpo sobre una molécula particular que contiene ese dominio. Algunos ejemplos de funciones efectoras son la fijación del complemento, transferencia placentaria, unión a la proteína estafilocócica, unión a la proteína estreptocócica G, unión
15 a células mononucleares, neutrófilos o mastocitos y basófilos. La asociación de regiones particulares y de isotipos de inmunoglobulinas particulares con estas funciones efectoras es bien conocida y se describe por ejemplo, en Immunology, Roitt et al., Mosby St. Louis, Mo. (1993 3ª ed.)

Además, el enlace de la Fc a la FcRn permitiría a las inmunoadhesinas persistir más tiempo en la circulación (Ober, R. J., Martínez, C., Vaccaro, C., Zhou, J. & Ward, E. S. Visualizing the Site and Dynamics of IgG Salvage by the MHC Class I-Related Receptor, FcRn. J Immunol 172,2021-2029 (2004)). Esto permitiría que la antitoxina se pudiera
20 usar con fines profilácticos.

El aumento de la eficacia de la proteína quimérica de receptor de toxina y de la molécula de inmunoadhesina o complejo cuando se produce en la célula huésped, en el tejido huésped o en el organismo huésped, célula de planta, tejido de planta o planta intacto, conlleva un incremento en la producción de moléculas y una reducción del coste de
25 producción cuando se procesan. Esta productividad podría ser el resultado de una mayor eficiencia en la producción de cadenas constituyentes de la proteína quimérica de receptor de toxina e inmunoadhesinas o complejos de inmunoadhesina y/o mayor eficacia en la asociación del complejo de inmunoadhesina. En el caso concreto de la proteína quimérica de receptor de toxina o inmunoadhesina que contienen tanto una porción de cadena pesada como de cadena ligera de inmunoglobulina, el aumento del nivel aparente de velocidad de la inmunoadhesina purificada o parcialmente purificada puede ser debido a una mayor disponibilidad de cadenas constituyentes, y/o a
30 una unión más eficaz del complejo, y/o a receptores multivalentes o a la combinación de todas ellas.

Una persona entendida en el tema comprenderá que las proteínas quiméricas de receptor de toxina descritas en este documento pueden ser modificadas según sea necesario para eliminar los dominios sensibles a la acción de las proteasas e incluir uniones en caso necesario para mejorar la función y la estabilidad. Los métodos de introducción
35 de estas modificaciones son muy conocidos en esta técnica; sin embargo, la naturaleza exacta de las modificaciones (por ejemplo, qué dominios quitar, la longitud y la ubicación de las uniones) no se conoce *a priori*.

Receptor de toxina

Un receptor de toxina es un polipéptido que se une a agentes patógenos, toxinas o cualquier proteína que provoquen o ayuden a provocar un efecto patogénico con suficiente afinidad y aidez para permitir que la proteína
40 quimérica de receptor de toxina actúe como receptor señuelo. Por ejemplo, en realizaciones antivirales o antibacterianas, se usan una o más proteínas de receptor que se unen eficazmente a virus, bacterias o bacteria de interés o subcomponentes como proteínas producidas por los virus o bacterias y necesarias para que el virus o bacteria inicie los procesos para llevar a cabo sus efectos patógenos. Muchas de estas proteínas de receptor ya son conocidas y aquellos con conocimientos generales de la técnica las pueden aplicar para aspectos poco apropiados
45 de la invención, sin llevar a cabo experimentos indebidos.

En la sección que lleva por título «Receptores quiméricos de la toxina del carbunco» se describen con más detalle los receptores del carbunco y los dominios apropiados para su uso en esta invención.

Complejo inmunoglobulínico

El complejo inmunoglobulínico puede incluir una porción de una cadena pesada de inmunoglobulina o una porción
50 de cadena pesada y una de cadena ligera de inmunoglobulina. Los dos componentes se pueden asociar entre sí de varios modos, como por ejemplo por enlaces covalentes como puentes disulfuro. Los complejos inmunoglobulínicos se asocian con al menos una proteína de receptor de toxina. La unión se puede hacer por medio de enlaces covalentes, interacción iónica, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, una interacción metal-ligando o cualquier otro tipo de interacción.

55 Cadena pesada de inmunoglobulina

Las proteínas quiméricas de receptor de toxina contienen al menos una porción de cadena pesada de inmunoglobulina que en cantidad suficiente confieren la capacidad de multimerizar la proteína de receptor de carbunco asociada, confieren funciones efectoras a los anticuerpos, estabilizan la proteína quimérica en las plantas, permiten la capacidad de ser purificadas por las proteínas A o G, o mejoran la farmacocinética.

- 5 Estas propiedades son atribuidas por los dominios constantes de las cadenas pesadas. Si la proteína quimérica de receptor de toxina solo contiene una cadena pesada de inmunoglobulina, la porción de la cadena pesada del complejo inmunoglobulínico contiene preferentemente al menos los dominios CH2 y CH3, o mejor, solamente CH2 y CH3. En caso de que la proteína quimérica de receptor de toxina contenga tanto cadena pesada como ligera, la porción de la cadena pesada del complejo inmunoglobulínico debe contener también preferentemente un dominio CH1.

Personas expertas en la técnica fácilmente identificarán las secuencias de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina. Por ejemplo, se pueden consultar un gran número de ADN inmunoglobulínico y de secuencias proteicas en el GenBank. La tabla 2 muestra los números de acceso a la secuencia de GenBank para los genes de la cadena pesada de inmunoglobulina y las proteínas codificadas por esos genes.

TABLA 2

Nº ACCESO GENBANK	SECUENCIA DE INMUNOGLOBULINA HUMANA	Nº SECUENCIA
J00220	Secuencia de codificación de dominio constante de cadena pesada Ig _d l	15, 52
J00220	Secuencia de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada Ig _d l	16
J00221	Secuencia de codificación de dominio constante de cadena pesada de IgA ₂	17, 53
J00221	Secuencia de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada IgA ₂	18
J00228	Secuencia de codificación de dominio constante de cadena pesada Ig _γ l	19, 54
J00228	Secuencia de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada Ig _γ l	20
J00230 V00554	Secuencia de codificación de dominio constante de cadena pesada IgG ₂	21, 55
J00230 V00554	Secuencia de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada IgG ₂	22
X03604 M12958	Secuencia de codificación de dominio constante de cadena pesada IgG ₃	23, 57
X03604 M12958	Secuencia de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada IgG ₃	24
K01316	Secuencia de codificación de dominio constante de cadena pesada IgG ₄	25
K01316	Secuencia de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada IgG ₄	26
K02876	Secuencia de codificación de dominio constante de cadena pesada IgD	27
K02876	Secuencia de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada IgD	28, 30, 32
K02877	Secuencia de codificación de dominio constante de cadena pesada IgD	29
K02877	Secuencia de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada IgD	28, 30, 32
K02878	Secuencia de codificación de cadena pesada IgD de Germline	31
K02878	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada IgD de Germline	28, 30, 32
K02879	Secuencia de codificación de dominio C-δ-3 de cadena pesada IgD de Germline	33

Nº ACCESO GENBANK	SECUENCIA DE INMUNOGLOBULINA HUMANA	Nº SECUENCIA
K02879	Secuencia de aminoácidos C-δ-3 de cadena pesada IgD de Germline	28, 30, 32
K01311	Secuencia de codificación CH1, dominio C- δ, J-δ de cadena pesada de IgD de Germline	58
K01311	Secuencia de aminoácidos CH1, dominio C-δ, J-δ de cadena pesada de IgD de Germline	28, 30, 32
K02880	Secuencia de codificación de término secretado, dominio C, gen de cadena pesada de IdG de Germline	36
K02880	Secuencia de aminoácidos de término secretado, dominio C, gen de cadena pesada de IdG de Germline	28, 30, 32
K02881	Secuencia de codificación del primer dominio de término de membrana, dominio C, gen de cadena pesada de IgD de Germline	38
K02881	Secuencia de aminoácidos del primer dominio de término de membrana, dominio C, gen de cadena pesada de IgD de Germline	28, 30, 32
K02882	Secuencia de codificación de cadena pesada de IdD de Germline	40
K02882	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de IdD de Germline	28, 30, 32
K02875	Secuencia de codificación de dominio C-δ-1, dominio C, gen de cadena pesada de IgD de Germline	42
K02875	Secuencia de aminoácidos de dominio C-δ-1, dominio C, gen de cadena pesada de IgD de Germline	28, 30, 32
L00022 J00227 V00555	Secuencia de codificación de dominio constante de cadena pesada IgE	59
L00022 J00227 V00555	Secuencia de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada IgE	60
X17115	Secuencia de codificación de secuencia completa de cadena pesada de IgM	61
X17115	Secuencia de aminoácidos de secuencia completa de cadena pesada de IgM	62

- 5 Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la porción de la molécula quimérica derivada de la cadena pesada de inmunoglobulina puede contener menos de una cadena pesada completa, siempre y cuando contenga la porción suficiente para conferir las propiedades anteriormente descritas.

La cadena pesada de inmunoglobulina puede ser de cualquiera de los tipos de inmunoglobulina G (IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄). La porción de la cadena pesada de inmunoglobulina puede contener CH1, CH2, o CH3 de las cadenas pesadas de IgG. También se contemplan varias combinaciones o subcombinaciones de estos dominios constantes.

Un experto en la técnica comprenderá que las inmunoglobulinas están formadas por dominios con aproximadamente 100 o 110 restos de aminoácidos. Estos dominios diversos son conocidos en la técnica y tienen limitaciones también conocidas. Gracias a la biología molecular moderna se puede realizar fácilmente la extracción de un solo dominio y su sustitución por un dominio de otra molécula de anticuerpo. Los dominios son estructuras globulares estabilizadas por puentes disulfuro intracadena. Esto les confiere una forma discreta y hace que los dominios sean una unidad individual que se pueda sustituir o intercambiar con otros dominios con una forma similar.

Inmunoglobulinas quiméricas de cadena pesada

En varios aspectos y realizaciones se observa una molécula quimérica de receptor de toxina cuyos dominios inmunoglobulínicos, que contienen la cadena pesada, derivan de diferentes isotipos de inmunoglobulinas de cadena pesada. Un experto en la técnica puede comprender que, mediante el uso de técnicas moleculares, se pueden

- 5 sustituir estos dominios por otros similares y así, poder producir una inmunoglobulina híbrida entre dos moléculas diferentes de inmunoglobulina. Estas inmunoglobulinas quiméricas permiten que las inmunoadhesinas que se construyan contengan varias propiedades diferentes e interesantes, gracias a los diferentes dominios de las inmunoglobulinas que las forman.
- 10 En ciertas realizaciones, las moléculas quiméricas de receptor de toxina contienen dominios de dos isotipos diferentes de cadenas pesadas de inmunoglobulina humana.
- 15 Consideramos inmunoglobulinas quiméricas de cadena pesada procedentes de distintas especies (humanas, murinas o de otros mamíferos). La presente invención considera la inmunoglobulina quimérica de cadena pesada que contiene dominios de inmunoglobulina derivados de al menos dos isotipos diferentes de inmunoglobulina de mamíferos. En general, se puede utilizar inmunoglobulina de cualquier tipo de mamífero en las realizaciones preferidas, como por ejemplo los siguientes isotipos: cualquier isotipo de IgG. La presente invención también contempla moléculas quiméricas que contienen dominios de inmunoglobulina derivados de dos isotipos diferentes de inmunoglobulina de roedor o primate. Los isotipos de inmunoglobulina de roedor o primate son bien conocidos en la técnica.
- 20 Las moléculas quiméricas de la presente invención pueden contener cadenas pesadas derivadas de inmunoglobulina que incluyan al menos uno de los siguientes dominios: los dominios CH1, CH2 o CH3 de IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 de murino; el dominio CH1 de IgG, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana; los dominios CH1, CH2 o CH3 de un isotipo IgG de mamífero; los dominios CH1, CH2 o CH3 de un isotipo de IgG de roedor; los dominios CH1, CH2 o CH3 de un isotipo de IgG de animal.
- 25 La presente invención también contempla la sustitución o adición de dominios de proteína, procedentes de moléculas de la superfamilia génica de las inmunoglobulinas, en las moléculas quiméricas. Las moléculas que pertenecen a la superfamilia génica de las inmunoglobulinas presentan homología de residuo de secuencia de aminoácidos y de secuencia de nucleótidos con las inmunoglobulinas. Las moléculas que forman parte de la superfamilia génica de las inmunoglobulinas se identifican gracias a la homología con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos. Véase, por ejemplo, p. 361 de *Immunoglobulin Genes*, Academic Press (1989).
- 30 *Inmunoglobulinas de cadena ligera*
- La porción de una cadena ligera de inmunoglobulina descrita en este documento es esa parte de la cadena ligera de inmunoglobulina suficiente para aumentar la estabilidad de los receptores quiméricos de toxina expresados. Se prefiere que las cadenas ligeras de esta invención incluyan, al menos, un dominio constante o una parte de un dominio constante suficientes para poder unirse a cualquiera de las cadenas pesadas aquí descritas. Así pues, la
- 35 la cadena puede tener menos de un dominio. La cadena ligera puede ser una cadena lambda o kappa.
- La identidad del receptor de toxina unido mediante enlaces covalentes a la cadena ligera se puede ajustar de modo que afecte a la afinidad y la avidez de la proteína quimérica de receptor de toxina o inmunoadhesina. Por ejemplo, si el receptor de toxina, que está unido mediante enlaces covalentes a la cadena ligera, es el mismo receptor de toxina que el que está unido a la cadena pesada, el mismo receptor de toxina, pero con una secuencia de aminoácidos diferente, debido a la presencia de diferentes dominios de receptor, o un receptor alternativo para la misma toxina, puede provocar un aumento de la avidez de la proteína quimérica de receptor de toxina. Por otra parte, la cadena ligera se puede unir mediante enlaces covalentes al receptor de otra toxina, creando así una proteína quimérica de receptor de toxina adecuada para actuar como receptor señuelo contra múltiples toxinas.
- 40 La unión entre los dominios de las cadenas ligeras y el dominio variable puede hacerse a través de cualquier tipo de enlace. La unión puede ser, por ejemplo, un enlace flexible polipeptídico tal que (Gly3Ser)3.
- 45 Se contempla la posibilidad de que las cadenas ligeras descritas en este documento también se pueden presentar en variaciones similares a las descritas para las cadenas pesadas de esta invención. Por ejemplo, los dominios constantes de la cadena ligera pueden ser derivados de diferentes organismos o especies.
- Unión entre el receptor de toxina y el complejo inmunoglobulínico*
- 50 La unión del complejo inmunoglobulínico y el receptor de toxina puede ocurrir por medio de un enlace entre la cadena ligera y el receptor de toxina, preferiblemente por un enlace entre la cadena pesada y el receptor de toxina, o mucho mejor, por ambos enlaces. Estos enlaces pueden tener lugar por medio de una unión que confiera suficiente flexibilidad a las inmunoadhesinas aquí descritas, de modo que actúen como receptor señuelo. Preferiblemente, una unión covalente como por ejemplo, un enlace peptídico covalente.
- 55 La unión puede ser por ejemplo, una secuencia natural de aminoácidos, una región bisagra de la inmunoglobulina, como la que están entre los dominios CH2 y CH3 de IgG, o un enlace polipeptídico flexible y sintético, como (Gly3Ser)3 o (Gly4Ser)3. Un receptor quimérico de toxina puede contener cualquier número de enlaces diferentes.
- Las inmunoadhesinas

- 5 Las inmunoadhesinas son polipéptidos que contienen al menos una proteína quimérica de receptor de toxina de esta invención. En algunas realizaciones, las inmunoadhesinas descritas en el presente documento también contienen una cadena J y/o un componente secretor. En otras realizaciones, las inmunoadhesinas contienen más de una proteína quimérica de receptor de toxina.

La cadena J

- 10 Las inmunoadhesinas de la presente invención puede contener, además de las proteínas quiméricas de receptor de toxina, una cadena J unida a las cadenas pesadas derivadas de la inmunoglobulina. En realizaciones preferidas, la inmunoadhesina de la presente invención está formada por dos o cuatro proteínas quiméricas del receptor de la toxina del carbunco y una cadena J unida al menos a una de las proteínas quiméricas. En la técnica se describe y se conoce la cadena J. Véase, por ejemplo, M. Koshland, The Immunoglobulin Helper: The J Chain, in Immunoglobulin Genes, Academic Press, London, pg. 345, (1989) y Matsuuchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83:456-460 (1986). La secuencia de la cadena J se puede consultar en varias bases de datos de los Estados Unidos.

El componente secretor

- 20 La inmunoadhesina también puede tener un componente secretor unido a la proteína quimérica de receptor de toxina. Esta unión puede ser mediante puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, enlaces covalentes, interacciones iónicas o combinaciones de todos estos tipos de unión.

- 25 La presente invención contempla el uso del componente secretor de un gran número de especies diferentes, como de humano, ratón, conejo, bóvido y similares. Las secuencias de nucleótidos para estas moléculas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la patente americana N.º 6.046.037 contiene muchas de estas secuencias. Las inmunoadhesinas de la presente invención que contienen el componente secretor, la proteína quimérica del receptor de la toxina del carbunco y la cadena J, suelen estar unidas por medio de uno de los siguientes enlaces: puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, enlaces covalentes, interacciones iónicas o combinaciones de todos estos tipos de unión.

Las inmunoadhesinas multiméricas

- 30 Las inmunoadhesinas pueden contener más de una molécula proteica de receptor, por ejemplo, pueden contener moléculas quiméricas de receptor de toxina, es decir, unidades monoméricas que no están unidas por puentes disulfuro a otras moléculas quiméricas de receptor de toxina. Las inmunoadhesinas pueden contener moléculas quiméricas de receptor de toxina unidas a otras moléculas quiméricas de receptor de toxina de modo que formen dímeros u otras moléculas multivalentes. La molécula quimérica de receptor de toxina se presenta normalmente en forma de dímero, pues se une con la porción inmunoglobulina de la molécula quimérica. La porción inmunoglobulina de la molécula quimérica de receptor de toxina permite que, debido a la unión de dos moléculas quiméricas del receptor de la toxina del carbunco, se forme una molécula dimérica con dos partes de unión activas formadas a partir de la porción proteína del receptor de toxina. En realizaciones preferidas, la dimerización tiene lugar mediante puentes disulfuro, normalmente, entre los dominios de inmunoglobulina como parte de una molécula de inmunoglobulina que ocurre de manera natural. Las personas expertas en esta técnica pueden entender que estos puentes disulfuro, presentes normalmente en moléculas de inmunoglobulina naturales, se pueden modificar, mover y eliminar, y aun así, seguir manteniendo la capacidad de formar un dímero con moléculas quiméricas de receptor de toxina.

- 45 La inmunoadhesina multimérica puede estar formada por cuatro moléculas quiméricas de receptor de toxina, dos de las cuales, derivadas de la fusión del receptor de toxina y de la cadena pesada de inmunoglobulina, están unidas entre sí por puentes disulfuro, además, cada una de estas moléculas unidas por puentes disulfuro, están igualmente unidas a otra molécula quimérica de receptor de toxina que procede de la fusión del receptor de toxina y una cadena ligera de inmunoglobulina, de modo que la forma resultante tiene estructura tetramérica.

- 50 En otras realizaciones preferidas, la inmunoadhesina contiene formas multiméricas de la molécula quimérica de receptor de toxina gracias a la unión de la cadena J con la porción inmunoglobulina de la molécula quimérica de receptor de toxina. La unión de la cadena J con el dímero formado por dos moléculas quiméricas de receptor de toxina permite la formación de estructuras tetraméricas de la inmunoadhesina.

La glicosilación específica de plantas

- 55 En ciertas realizaciones de la presente invención, las inmunoadhesinas y las proteínas quiméricas de receptor de toxina descritas anteriormente son expresadas por métodos que generan proteínas con glicosilación específica de plantas. Es bien sabido en la técnica que la glicosilación es una importante modificación proteica de células eucarióticas de plantas, mamíferos o insectos (Lerouge et al., Plant Molecular Biology 38:31-48, 1998). El proceso de glicosilación comienza en el retículo endoplasmático con la transferencia de un oligosacárido precursor a un residuo específico de la cadena polipeptídica nascente. El proceso de transformación de este oligosacárido en diferentes tipos de glicanos, que difieren en los tipos de residuos presentes y en la naturaleza de los enlaces entre los residuos, se produce en la ruta secretora, a medida que la glicoproteína avanza desde el retículo endoplasmático hasta su destino final. Una persona experta en la técnica comprenderá que al final de su maduración, las proteínas

5 expresadas en plantas o en células de plantas tendrán un modelo de glicosilación diferente al que tienen las proteínas expresadas en otros tipos celulares, incluyendo células de mamífero y células de insecto. Se han realizado estudios detallados que describen la glicosilación específica de plantas y su comparación con la glicosilación en otros tipos celulares. Véase, por ejemplo, Cabanes-Macheteau et al., *Glycobiology* 9(4):365-372 (1999), y Altmann, *Glycoconjugate J.* 14:643-646 (1997). Estos y otros grupos han demostrado que la glicosilación específica de
10 plantas genera glicanos que tienen xilosa unida por enlaces $\beta(1,2)$ a manosa, si bien la xilosa no está unida por enlaces $\beta(1,2)$ a manosa como resultado de la glicosilación en células de mamífero e insecto. La glicosilación específica de plantas da como resultado una fucosa unida por enlaces $\alpha(1,3)$ a GlcNAc proximal, mientras que la glicosilación en células de mamífero da como resultado una fucosa unida por enlaces $\alpha(1,6)$ al GlcNAc proximal. Adicionalmente, la glicosilación específica de plantas no da como resultado la adición de un ácido siálico al extremo terminal de la proteína de glicano, mientras que en la glicosilación en células de mamífero se añade ácido siálico.

Las secuencias de aminoácidos de todos los polipéptidos que forman las inmunoadhesinas y la proteína quimérica de receptor de toxina de esta invención son conocidas. Una persona experta en la técnica sabrá que los sitios de glicosilación son el tripéptido Asn-X-Ser/Thr, en el que X puede ser cualquier aminoácido, a excepción de la prolina y el ácido aspártico (Kornfeld y Kornfeld, *Annu Rev Biochem* 54:631-664, 1985). Por lo tanto, un experto en la técnica
20 también sabrá cuáles de los aminoácidos de los polipéptidos que forman las proteínas descritas en el presente documento tienen glicosilación específica de plantas.

En otros aspectos y realizaciones preferidas de la presente invención, la inmunoadhesina con glicosilación específica de plantas, está formada, además, por una cadena J y un componente secretor asociados a la molécula quimérica ya mencionada. Como era el caso con respecto a la molécula quimérica, una persona experta en la técnica será capaz de identificar los emplazamientos de glicosilación específica de plantas en las secuencias de la
25 cadena J y del componente secretor.

Si se desea, la glicosilación específica de plantas puede ser modificada añadiendo secuencias que dirijan el proceso de post-traduccion del polipéptido de planta, que forma las proteínas quiméricas de receptor de toxina y las inmunoadhesinas, hacia otros sitio que no sea el retículo endoplasmático, de modo que se genere un proceso de glicosilación post-traduccion en el que se reduzcan sustancialmente, o incluso se eliminan, los enlaces xilosa y fucosa. Si se añade la secuencia KDEL, que codifica el C-terminal de la inmunoglobulina, se obtiene este tipo de glicosilación modificada.

En otros aspectos y realizaciones preferidas de la invención puede ser conveniente eliminar la N-glicosilación o la O-glicosilación, o incluso ambas formas de glicosilación, en especial si no es necesaria la interacción del receptor Fc para producir una proteína/inmunoadhesina quimérica funcional de receptor de toxina, para así prevenir, o tratar, los efectos patológicos de un virus, una bacteria, un hongo o una molécula tóxica producida o presentada en el sujeto al que se le administra el producto.

Los derivados funcionales

En el presente documento también se describen derivados funcionales de la inmunoadhesina y de la proteína quimérica de receptor de toxina. Por "derivado funcional" se entiende un «derivado químico», «fragmento» o «variante» del polipéptido o ácido nucleico de la invención que retiene al menos una parte de la función de la proteína, por ejemplo la reactividad con un anticuerpo específico de la proteína, actividad enzimática o actividad de enlace, que permite su utilidad según la presente invención. Es bien conocido en la técnica que, debido a la degeneración del código genético, numerosas secuencias diferentes de ácidos nucleicos pueden codificar la misma
45 secuencia de aminoácidos. Igualmente es bien conocido en la técnica que se pueden realizar cambios conservativos en los aminoácidos para llegar a una proteína o polipéptido que retenga la funcionalidad del original. En ambos casos, se pretende que todas las permutaciones queden abarcadas por esta memoria descriptiva.

Los derivados también se pueden diseñar según procedimientos de rutina para incluir una etiqueta de purificación por afinidad de manera que se pueden producir grandes cantidades y/o cantidades relativamente puras o aisladas de inmunoadhesina. Existen muchas versiones de etiquetas que se pueden incorporar en uno o más componentes de la inmunoadhesina, preferiblemente sin destruir la actividad de enlace deseada de la inmunoadhesina en ausencia de la etiqueta. Dichas etiquetas se pueden diseñar en forma de una secuencia de ácidos nucleicos que se puede expresar fusionada con las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las inmunoadhesinas de la invención. Las etiquetas también se pueden diseñar para que se puedan eliminar, por ejemplo, mediante una enzima
55 comercialmente disponible.

Además, es posible borrar codones o sustituir uno o más codones con otros codones que no sean degenerados para producir un polipéptido estructuralmente modificado, pero con la misma utilidad o actividad que el polipéptido producido por la molécula de ácido nucleico no modificada. Tal y como se reconoce en la técnica, los dos polipéptidos pueden ser equivalentes funcionales, tal y como ocurre con las dos moléculas de ácido nucleico que causan su producción, incluso aunque las diferencias entre las moléculas de ácido nucleico no estén relacionadas con la degeneración del código genético.

- 5 Se pueden implementar manipulaciones de este tipo, así como la derivatización química tras la producción, por ejemplo, para mejorar la estabilidad, la solubilidad, la absorción, el efecto biológico o terapéutico, y/o la semivida biológica. Los restos capaces de mediar estos efectos se desvelan en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990). Un derivado funcional, que se pretende abarcar en la presente invención, es un polipéptido "variante" que carezca de uno o más aminoácidos, que contenga aminoácidos adicionales o de reemplazo en relación al polipéptido natural. El variante puede proceder de un componente
- 10 compuesto natural si se modifica adecuadamente la secuencia de codificación del ADN de la proteína para añadir, eliminar y/o modificar los codones de uno o más aminoácidos en uno o más sitios del C-terminal, N-terminal y/o en la secuencia natural. Se entiende que estas variantes que tienen aminoácidos añadidos, sustituidos y/o adicionales retienen una o más porciones caracterizantes de la proteína nativa, tal como se ha descrito anteriormente.
- 15 Se puede preparar un derivado funcional de una proteína con restos de aminoácidos borrados, insertados y/o sustituidos, mediante técnicas convencionales que ya conocen las personas expertas en la técnica. Por ejemplo, los componentes modificados de los derivados funcionales se pueden producir usando técnicas de mutagénesis dirigida a la posición (como se ejemplifica por Adelman et al., 1983, DNA 2:183) en la que los nucleótidos de la secuencia de codificación del ADN se modifican para producir una secuencia de codificación modificada, y posteriormente
- 20 expresar el ADN recombinante en una célula huésped procariota o eucariota, usando técnicas como las anteriormente descritas. Alternativamente, las proteínas con deleciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácidos se pueden preparar convenientemente mediante síntesis química directa, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Los derivados funcionales de las proteínas exhiben normalmente la misma actividad biológica cualitativa que las proteínas naturales.
- 25 Además, las inmunoadhesinas de la invención pueden ser, no solo inmunoadhesinas quiméricas de receptor Ig modificadas, sino también abarcar otros miembros naturales de la familia de las proteínas de receptor, isotipos, y/u otras secuencias de aminoácidos homólogas, por ejemplo de ser humano, primate, roedor, canino, felino, bovino, aviar, etc. El tipo de Ig usado en las inmunoadhesinas puede variar, por ejemplo, puede asumir una identidad de un miembro diferente de la familia de las Ig, incluido o no en una especie dada. Las Igs son diversas y tienen 15
- 30 secuencias bien conocidas, a través de las cuales, una persona no experta en la técnica puede aprovechar para crear inmunoadhesinas diferentes que tengan una utilidad más o menos diferente en un organismo dado sometido a tratamiento.

Las proteínas quiméricas del receptor de la toxina del carbunco y las inmunoadhesinas

- 35 La invención también incluye las proteínas quiméricas del receptor de la toxina del carbunco según se establece en la reivindicación 1. Opcionalmente, con el fin de mejorar la estabilidad, también se puede incluir en el compuesto una cadena ligera de inmunoglobulina. Por otra parte, se puede incluir en el complejo un receptor de la toxina del carbunco asociado a la cadena ligera de inmunoglobulina o a un fragmento de cadena ligera, en ambos casos preferiblemente en el N-terminal, para mejorar la estabilidad y/o aportar receptores adicionales de la toxina del carbunco y potenciar el enlace con la toxina del carbunco.
- 40 Una proteína de receptor de toxina se puede asociar con una cadena pesada, una cadena ligera, o ambas cadenas. En algunas realizaciones, una cadena J y un componente secretor, van asociados con una proteína quimérica de receptor de toxina para formar una inmunoadhesina. En otras realizaciones, la proteína quimérica de receptor de toxina tiene una glicosilación específica de planta.

La proteína quimérica de receptor de la toxina del carbunco

- 45 Las proteínas quiméricas del receptor de la toxina del carbunco descritas en el presente documento contienen al menos una proteína del receptor de la toxina del carbunco unida a un complejo inmunoglobulínico que contiene una cadena pesada de inmunoglobulina.

El receptor de la toxina del carbunco

- 50 El receptor de la toxina del carbunco es cualquier polipéptido que se una al antígeno protector (PA) con suficiente afinidad para permitir que la proteína quimérica de receptor de toxina actúe como receptor señuelo.

El receptor de la toxina del carbunco según este documento es un factor 2 de morfogenia capilar humana (CMG2) (Scobie et al., 2001). El receptor funciona como una proteína transmembrana tipo 1 y tiene, al igual que un péptido señal, un dominio extracelular y una región transmembrana de paso único. Se han podido predecir varias isoformas proteicas, incluso variantes solubles, mediante el proceso de *splicing*.

- 55 El receptor de la toxina del carbunco, descrito en el presente documento, debe contener como mínimo elementos funcionales para unirse al PA y puede contener también uno o más polipéptidos adicionales (por ejemplo alguno que facilite el uso del receptor de la toxina del carbunco como receptor señuelo). Los dominios que unen el ATR al PA se han determinado correctamente (32-27). El dominio A del factor de Van Willebrand (dominio VWA), también conocido como dominio de la integrina (dominio I), contiene un sitio de adhesión dependiente de ion metálico (MIDAS) esencial para una correcta unión del PA con el receptor. Véase Scobie HM, Rainey GJ, Bradley KA, Young JA (2003) Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. Proc
- 60

- 5 Natl Acad Sci USA 100: 5170-5174. Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JA (2001) Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. Nature 414:225-229. En realizaciones preferidas, la proteína del receptor de la toxina del carbunco contiene el dominio extracelular completo del receptor.

Al receptor de la toxina del carbunco de esta invención le faltan los 14 aminoácidos que no forman parte del dominio VWA/I. Esta secuencia de 14 aminoácidos y su secuencia nucleótida correspondiente se pueden ver a continuación:

10 TEILELQPSSVCVG (SEC ID N.º: 102)

act gaa atc cta gaa ttg cag ccc tca agt gtc tgt gtg ggg (SEC ID N.º: 103)

Los vectores, las células y las plantas que contienen proteínas quiméricas de receptor de toxinas e inmunoadhesinas

- 15 La presente invención también contempla los vectores de expresión y clonación, las células y las plantas que contienen los receptores quiméricos de toxina y las inmunoadhesinas de la presente invención. La tecnología para aislar los genes que codifican las diferentes porciones proteína es bien conocida de una persona experta en la técnica y se puede aplicar para insertar los diferentes genes necesarios en los vectores de expresión y los vectores de clonación de forma que dichos vectores se puedan transfectar a células eucariotas tales como células de plantas, plantas y plantas transgénicas.

- 20 La presente invención contempla un método de ensamblaje de una inmunoadhesina siguiendo estos pasos: introducir dentro de un organismo de un segmento de ADN codificado a una molécula quimérica de proteína de receptor, cadena J, e introducir, dentro del mismo organismo, ADN codificado a componente secretor. El componente secretor de preferencia contiene como mínimo un segmento de los residuos 1 al 606 de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina polimérica humana (plgR) o residuos de aminoácidos
25 análogos de otras especies (Mostov, Ann Dev. Immu. 12:63-84 1994). De entre las secuencias del componente secretor que se utilicen, junto con la llamada en adelante plgR humana, están las que contienen al menos un segmento de los residuos 1 al 627 de aminoácidos de la plgR humana.

- La presente invención contempla células eucariotas, entre las que se incluyen las células de plantas que contienen los receptores quiméricos de toxina y las inmunoadhesinas de la presente invención. La presente invención también
30 contempla células vegetales con secuencias nucleótidas que codifican los diversos componentes de los receptores quiméricos de toxina y las inmunoadhesinas de esta invención. Una persona experta en la técnica comprenderá que la secuencia de nucleótidos que codifican el componente de secreción de la proteína protectora, la molécula de la proteína quimérica de receptor y la cadena J se unirán normalmente a un promotor y se presentarán como parte de un vector o casete de expresión. Si la célula eucariota es de planta, normalmente, el promotor que se use será uno
35 que pueda operar en una célula de planta. Una vez separados los genes de las proteínas de receptor, los del componente secretor y los de la cadena J, estos operan normalmente unidos a un promotor de transcripción de un vector de expresión. La presente invención también contempla vectores de expresión, cuya secuencia nucleótida codifica la molécula de proteína quimérica de receptor y está unida a una secuencia reguladora para su expresión. Estos factores de expresión sitúan la secuencia de nucleótidos que se va a expresar en la célula 3' de una
40 secuencia promotora que hace que se transcriba y se exprese la secuencia de nucleótidos. El vector de expresión también puede contener secuencias de mejora que favorezcan la eficacia de la transcripción. Además, para incrementar la cantidad de secuencia de nucleótidos que se transcribe dentro de una célula en concreto, se pueden incluir secuencias como por ejemplo terminadores, emplazamientos de poliadenilación u otras señales del extremo 3'.

- 45 La expresión de los componentes del organismo de elección puede ser causada por un plásmido de replicación independiente, por un componente permanente del cromosoma, o por cualquier fragmento de ADN que pueda dar lugar a transcripciones que codifican los componentes. Los organismos adecuados para la transformación pueden ser tanto procariotas como eucariotas. La introducción de los componentes del compuesto se puede hacer por transformación directa de ADN, por biolística hacia el interior del organismo o a través de otro organismo, como por
50 ejemplo, con ayuda de la acción recombinante de la *Agrobacterium* en las células vegetales. La expresión proteica en los organismos transgénicos requiere una co-introducción de un elemento promotor adecuado y una señal de poliadenilación. En una realización de la invención, el elemento promotor causa potencialmente la expresión constitutiva de los componentes de todas las células de una planta. La expresión constitutiva que tiene lugar en la mayoría o en todas las células garantiza que los precursores puedan ocupar el mismo sistema de endomembranas
55 necesario para que tenga lugar el ensamblaje.

Los vectores de expresión

- Para expresar los genes de la presente invención se han usado, preferiblemente, vectores de expresión compatibles con las células huésped. Los vectores de expresión que se usan normalmente para la expresión génica de plantas son bien conocidos en la técnica e incluyen vectores procedentes de plásmidos inductores de tumores (Ti) de
60 *Agrobacterium tumefaciens*, descritos por Rogers et al., Meth. in Enzymol., 153:253-277 (1987). Sin embargo, se sabe que otros muchos sistemas de vectores de expresión también funcionan en plantas. Véase por ejemplo, Verma et al., PCT Publication No. WO87/00551; y Cocking and Davey, Science, 236:1259-1262 (1987).

5 Los vectores de expresión descritos anteriormente presentan elementos de control de expresión tales como promotores. Los genes que se expresan se unen a un vector de expresión para permitir a la secuencia promotora que ejecute la unión y la síntesis del ARN polimerasa del gen codificador polipéptido deseado. En la expresión génica son útiles los promotores, pues son inducibles, virales, sintéticos, constitutivos y regulados. La elección de
10 qué vector de expresión utilizar y, en última instancia, a qué promotor se debe unir operativamente una parte de la secuencia nucleótida que codifica parte de la inmunoadhesina de la presente invención, depende directamente, como ya se conoce en la técnica, de las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo, de la localización y el tiempo de la expresión proteica y de la célula huésped que se transforme, siendo estas limitaciones inherentes en la técnica de construcción de moléculas del ADN recombinante. Sin embargo, un vector de expresión útil para poner en
15 práctica la presente invención debe tener al menos la capacidad de permitir la replicación, y preferiblemente, permitir también la expresión del gen codificante del polipéptido incluido en el segmento de ADN al que está unido.

En realizaciones preferidas, el vector de expresión utilizado para expresar los genes contiene un marcador de selección efectivo en células vegetales, preferiblemente un marcador de selección de resistencia a drogas. Un marcador de resistencia a drogas preferido es el gen cuya expresión da como resultado la resistencia a la kanamicina, es decir, contiene un gen quimérico compuesto del promotor de nopalina - sintasa, la región
20 codificadora de Tn5 que codifica la enzima neomicin - fosfotransferasa y el terminador 3' de nopalina - sintasa, tal y como lo describen Rogers et al., en *Methods For Plant Molecular Biology*, Weissbach y H. Weissbach, eds., Academic Press Inc., San Diego, California (1988). Un vector de expresión de plantas útil se puede adquirir en Pharmacia, Piscataway, N.J. Los vectores de expresión y los promotores de expresión de proteínas extrañas en plantas fueron descritos en las patentes americanas N°s 5.188.642, 5.349.124, 5.352.605 y 5.034.322.

25 La construcción de vectores de expresión

Se han desarrollado diversos métodos para unir el ADN a vectores mediante extremos complementarios de cohesión. Por ejemplo, se pueden añadir regiones de homopolímeros complementarios al segmento de ADN para insertarlos en el vector de ADN. El vector y el segmento de ADN están unidos por puentes de hidrógeno a las colas complementarias de homopolímeros para formar moléculas de ADN recombinante. Por otra parte, se pueden usar
30 enlaces sintéticos con uno o más endonucleasas de restricción para unir el segmento de ADN al vector de expresión. Se añaden enlaces sintéticos a los segmentos de ADN romo; para ello se incuban los segmentos de ADN romo con gran cantidad de moléculas de enlace sintéticas en presencia de una enzima con capacidad de catalizar la formación de enlaces entre las moléculas de ADN romo; un ejemplo de esta enzima sería la ADN ligasa T4 procedente de un bacteriófago. Así, los productos resultado de la reacción son segmentos de ADN que transportan
35 secuencias sintéticas de enlace en sus extremos. Una endonucleasa de restricción apropiada corta los segmentos de ADN que luego se unen para formar un vector de expresión. Este vector se rompe por la acción de una enzima que produce terminales compatibles con los del enlace sintético. Los enlaces sintéticos que contienen varios sitios de restricción están disponibles en el mercado en numerosas fuentes como New England BioLabs, Beverly, Mass.

40 Las secuencias de nucleótidos que codifican el componente secretor, la cadena J y la molécula de proteína quimérica de receptor descrita en la presente invención, se introducen en la misma célula de planta, ya sea directamente o introduciendo cada componente en una célula de planta, regenerando una planta y utilizando métodos de hibridación cruzada de varios componentes para producir la célula de planta final de modo que contenga todos los componentes necesarios.

La expresión de receptores quiméricos de toxina y de inmunoadhesinas

45 Para introducir las secuencias nucleótidas que codifican los componentes de los receptores quiméricos de toxina y las inmunoadhesinas de la presente invención, podemos utilizar cualquier método. Entre los métodos de introducción de genes en plantas encontramos, por ejemplo, la *Técnica de Agrobacterium* para formación de plantas, la transformación de protoplasma, la transferencia génica al polen, la inyección dentro de los órganos reproductores y la inyección dentro del embrión maduro. Cada uno de estos métodos tiene ventajas y desventajas. Así pues, un
50 método concreto para introducir genes en una célula eucariótica en particular, puede no ser el método más efectivo para otra célula eucariótica u otra especie de planta.

Las plantas

Entre los métodos de introducción de genes en plantas encontramos, por ejemplo, la *Técnica de Agrobacterium* para la transformación de plantas, la transformación de protoplasma, la transferencia génica al polen, la inyección dentro
55 de los órganos reproductores y la inyección dentro del embrión maduro. Cada uno de estos métodos tiene ventajas y desventajas. Así pues, un método concreto para introducir genes en una célula eucariótica en particular, puede no ser el método más efectivo para otra célula eucariótica y especie de planta.

La introducción de los genes en las células vegetales se puede hacer de manera transitoria para producir de manera rápida una proteína deseada sin alterar de forma permanente o estable el genoma de una planta ni su
60 descendencia. Un ejemplo de cómo realizar esta expresión transitoria sería por infiltración de los espacios de aire intracelulares en las hojas de una planta intacta mediante una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* que contenga el gen o los genes de interés de un vector binario y cultivando dichas hojas para, luego, proceder a la

- 5 extracción de la proteína. Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. The Plant Journal 33: 949-956.

La *Técnica de Agrobacterium tumefaciens* es un sistema popularmente utilizado de transfección génica en células vegetales, pues el ADN se puede introducir en tejidos vegetales completos, transfiriendo la necesidad de regeneración desde una planta intacta a un protoplasma. El uso de vectores de expresión por la *Técnica de Agrobacterium* para introducir ADN en células vegetales es conocido en esta técnica. Véase, por ejemplo, los métodos descritos por Fraley et al., Biotechnology, 3:629 (1985) y Rogers et al., Methods in Enzymology, 153:253-277 (1987). Además, la integración del ADN de Ti es un proceso relativamente exacto, no siendo necesario realizar muchas modificaciones. La región del ADN que se transfiere queda delimitada por los bordes de las secuencias y el ADN interviniente se inserta normalmente en el genoma de la planta tal y como describe Spielmann et al., Mol. Gen. Genet., 205:34 (1986) y Jorgensen et al., Mol. Gen. Genet., 207:471 (1987). Hay modernos vectores de transformación por la *Técnica de Agrobacterium* que son capaces de replicar tanto *Escherichia coli* como *Agrobacterium*, por lo tanto permiten que se hagan las manipulaciones convenientes, tal y como describe Klee et al., en Plant DNA Infectious Agents, T. Hohn y J. Schell, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 179-203 (1985). Además, los recientes avances tecnológicos en los vectores de transferencia por la *Técnica de Agrobacterium* han mejorado la disposición de los genes y los sitios de restricción en los vectores para facilitar la construcción de vectores capaces de expresar diversos genes que codifican para polipéptidos. Los vectores que describe Rogers et al., Methods in Enzymology, 153:253 (1987), muestran sitios polilinker, flanqueados por un promotor, y un emplazamiento de poliadenilación, para una expresión directa de los genes transfectados que codifican para polipéptidos, y que son, por tanto, apropiados para este fin.

Para las especies vegetales en las que la *Técnica de Agrobacterium* es eficiente, este es el método de elección debido a su carácter fácil y definido en lo que respecta a la transfección génica. La *Técnica de Agrobacterium* para transformar hojas de discos y otros tejidos parece estar limitada a las especies vegetales que sufren infecciones naturales por *Agrobacterium tumefaciens*. Por lo tanto, la *Técnica de Agrobacterium* es más eficaz en plantas dicotiledóneas.

Muy pocas monocotiledóneas parecen ser huéspedes naturales de *Agrobacterium*, si bien, se han producido algunas plantas transgénicas usando la *Técnica de Agrobacterium*, tal y como describe Bytebier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84:5345 (1987). Por lo tanto, cereales importantes desde el punto de vista comercial como el arroz, el maíz y el trigo se deben transformar usando métodos alternativos. La transformación de protoplastos vegetales se puede realizar con métodos basados en el precipitado de fosfato calcio, con tratamiento con polietilenglicol, con electroporación y con combinaciones de estos tratamientos. Véase, por ejemplo, Potrykus et al., Mol. Gen. Genet., 199:183 (1985); Lorz et al., Mol. Gen. Genet., 199:178 (1985); Fromm et al., Nature, 319:791 (1986); Uchimiya et al., Mol. Gen. Genet., 204:204 (1986); Callis et al., Genes and Development, 1:1183 (1987); y Marcotte et al., Nature, 335:454 (1988).

La aplicación de estos métodos a distintas especies de plantas depende de la capacidad de regeneración de esa especie de planta a partir de protoplastos. Los métodos ilustrativos para la regeneración de cereales a partir de protoplastos están descritos en Fujimura et al., Plant Tissue Culture Letters, 2:74 (1985); Toriyama et al., Theor Appl. Genet., 73:16 (1986); Yamada et al., Plant Cell Rep., 4:85 (1986); Abdullah et al., Biotechnology, 4:1087 (1986).

Para transformar especies vegetales que no se puedan regenerar a partir de protoplastos, se pueden utilizar otros métodos de transfección de ADN a células intactas o a tejidos. Por ejemplo, la regeneración de cereales a partir de embriones inmaduros o explantos se puede realizar tal y como describe Vasil, Biotechnology, 6:397 (1988). Además, también se pueden utilizar "pistolas de partículas" o microproyectiles de alta velocidad. Con esta tecnología, el ADN se transporta a través de la pared celular y entra en el citoplasma sobre la superficie (0,525 μm) de pequeñas partículas metálicas, aceleradas a velocidades de uno o varios cientos de metros por segundo, según describe Klein et al., Nature, 327:70 (1987); Klein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:8502 (1988); y McCabe et al., Biotechnology, 6:923 (1988). Las partículas metálicas penetran en varias capas celulares y por lo tanto permiten la transformación de las células dentro del tejido explanto. Las partículas metálicas se usan para transformar con éxito las células de maíz y para producir plantas de tabaco y soja fértiles de transformación estable. La transformación de tejido de explantos evita el paso por una fase protoplástica, y por lo tanto, acelera la producción de plantas transgénicas.

También se puede insertar el ADN en plantas mediante transfección directa de ADN en el polen, tal y como describe Zhou et al., Methods in Enzymology, 101:433 (1983); D. Hess, Intern Rev. Cytol., 107:367 (1987); Luo et al., Plant Mol. Biol. Reporter, 6:165 (1988). La expresión de genes que codifican para polipéptidos se puede obtener inyectando ADN en los órganos reproductores de la planta, según describe Pena et al., Nature, 325:274 (1987). El ADN también se puede inyectar directamente en las células de embriones inmaduros y en células rehidratadas de embriones disecados, tal y como describe Neuhaus et al., Theor. Appl. Genet., 75:30 (1987); y Benbrook et al., in Proceedings Bio Expo 1986, Butterworth, Stoneham, Mass., pp. 27-54 (1986).

La regeneración de plantas a partir de protoplastos de plantas individuales o de varios explantos es bien conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Methods for Plant Molecular Biology, A. Weissbach and H. Weissbach, eds.,

- 5 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (1988). Este proceso de regeneración y crecimiento incluye los siguientes pasos: selección de las células diana y de brotes, enraizamiento de los brotes transformantes y crecimiento de las plantas en suelo.

La regeneración de las plantas que contienen el gen extraño introducido por la *Técnica de Agrobacterium tumefaciens*, procedente de hojas de explantos, se puede conseguir según lo describe Horsch et al., Science, 227:1229-1231 (1985). Según este procedimiento, los transformantes crecen en presencia de un agente de selección en un medio que induce la regeneración de los brotes en las especies vegetales en transformación, tal y como lo describen Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:4803 (1983). Por este procedimiento se suelen producir brotes en un plazo de dos a cuatro semanas y estos brotes transformantes se transfieren posteriormente a un medio inductor adecuado para la formación de raíces con un agente selectivo y un antibiótico para prevenir la proliferación de bacterias. Los brotes transformantes que forman raíz en presencia del agente selectivo para formar plantas, son transplantados a la tierra para favorecer la producción de raíces. Estos procedimientos pueden variar en función de la especie de planta particular que se use, siendo estas variaciones conocidas en la técnica.

Las inmunoadhesinas de la presente invención se pueden producir a partir de cualquier célula de planta, como por ejemplo, de células procedentes de plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas, solanáceas, alfalfa, legumbres, semillas oleaginosas como el cártamo, o el tabaco.

Las plantas transgénicas de la presente invención se pueden obtener a partir de especies de plantas susceptibles a la polinización cruzada, usando cualquier método de transformación conocido por una persona experta en la técnica. Entre las especies de plantas útiles están las dicotiledóneas como el tabaco, el tomate, las legumbres, la alfalfa, el roble o el arce; o las monocotiledóneas como la hierba, las plantas de grano, la avena, el trigo o la cebada; o plantas con baja capacidad de fecundación, como las gimnospermas, las coníferas, las colas de caballo, los musgos, las hepáticas, los hornabeques, las algas, los gametofitos, los esporofitos o los teridofitos.

Las células eucariotas

La presente invención también contempla la expresión de los receptores quiméricos de toxina y las inmunoadhesinas dentro de células eucariotas como pueden ser las células de mamíferos. Una persona entendida en la técnica comprenderá los diversos sistemas disponibles para la expresión en células de mamíferos, y podrá modificar fácilmente estos sistemas de modo que se puedan expresar las inmunoadhesinas y las moléculas quiméricas de receptor de proteína.

Los compuestos que contienen receptores quiméricos de toxina y las inmunoadhesinas

La presente invención también contempla compuestos que contienen los receptores quiméricos de toxina o las inmunoadhesinas de la presente invención, junto con macromoléculas o material de plantas. Normalmente, estas macromoléculas o material de plantas proceden de alguna planta útil para la presente invención. Las macromoléculas de planta están presentes, junto con el receptor quimérico de toxina o la inmunoadhesina presentes en esta invención, en por ejemplo una célula de planta, en un extracto de una célula de planta o en una planta. Las macromoléculas de planta típicas en un compuesto son la ribulosa bífosfato carboxilasa, los pigmentos del complejo cosechador de luz (LHCP), los metabolitos secundarios o la clorofila. Los compuestos de la presente invención tienen material de planta o macromoléculas vegetales presentes a una concentración de 0,01% a 99% en masa excluyendo el agua. Otras composiciones tienen los receptores quiméricos de toxina o las inmunoadhesinas de la presente invención a una concentración de entre el 1% y el 99% en masa excluyendo el agua. Otras composiciones incluyen los receptores quiméricos de toxina y las inmunoadhesinas a una concentración de entre el 50% y el 90% en masa excluyendo el agua.

Las composiciones de la presente invención pueden contener material de planta o macromoléculas vegetales a una concentración de 0,1% a 5% en masa excluyendo el agua. Normalmente, la masa presente en la composición consistirá en macromoléculas de plantas y en los receptores quiméricos de toxina o en las inmunoadhesinas de la presente invención. Cuando las proteínas de la presente invención están presentes a concentraciones más altas o más bajas, la concentración de las macromoléculas de plantas presentes en la composición varía inversamente. En otras realizaciones, la composición de las moléculas de planta se presenta a concentraciones entre el 0,12% y el 1% en masa excluyendo el agua.

La presente invención contempla la composición de materia formada por todos o algunos de estos componentes: una molécula quimérica de receptor de proteína, una cadena J o un componente secretor. Estos componentes forman un compuesto y están asociados tal y como se describió anteriormente. La composición también puede contener moléculas procedentes de plantas. Esta composición se puede obtener también después de un proceso de extracción que genere un receptor funcional quimérico de toxina o una inmunoadhesina y moléculas procedentes de plantas.

El método de extracción indica que hay que aplicar una fuerza a una planta que contenga la composición, donde, por medio de un compartimento apoplástico de la planta, este se rompe y libera dicha composición. La fuerza aplicada rompe el compartimento y libera el líquido apoplástico. La planta completa, o el extracto de planta, contiene una mezcla de receptor quimérico de toxina/inmunoadhesina y otras moléculas de planta. Entre las moléculas de la

- 5 mezcla se encuentra la ribulosa bifosfato carboxilasa (RuBisCo) o fragmentos de la misma. Otra de las macromoléculas es el LHCP. Otra de las moléculas es la clorofila. Otros de los métodos útiles para preparar las composiciones son la extracción de varios solventes y la aplicación de vacío al material de la planta. Las composiciones de la presente invención pueden contener material o macromoléculas de planta a una concentración de 0,1% a 5% en masa excluyendo el agua.
- 10 La presente invención también contempla que la proporción relativa de las moléculas de plantas y las moléculas de animales puede variar. Las cantidades de las proteínas específicas de planta, tales como RuBisCo o la clorofila, pueden ser tan pequeñas como 0,01% de la masa o tan grandes como 99,9% de la masa del extracto, excluyendo el agua.
- 15 La presente invención también contempla las composiciones terapéuticas que se podrán usar en el tratamiento de un paciente o de un animal. La administración de la composición terapéutica se podrá hacer antes o después de la extracción de la planta u otro organismo transgénico. Una vez extraído el receptor quimérico de toxina/inmunoadhesinas se puede purificar mediante técnicas convencionales, tales como exclusión por tamaño, intercambio iónico o cromatografía de afinidad. Se pueden coadministrar moléculas de planta junto con el compuesto.
- 20 La presente invención también contempla el uso de los extractos de plantas con fines terapéuticos y que contienen receptores quiméricos de toxina/inmunoadhesinas sin ninguna purificación adicional del compuesto terapéutico específico. La administración puede ser por vía tópica, ingestión oral, spray nasal o cualquier otro método adecuado para liberar los receptores quiméricos de toxina/inmunoadhesinas al patógeno diana que afecta a la mucosa.
- Los compuestos farmacéuticos, las fórmulas y las vías de administración
- 25 Los receptores quiméricos de toxina/inmunoadhesinas descritos en el presente documento se pueden administrar a pacientes en forma de un compuesto farmacéutico adecuado. Dicha composición puede incluir componentes adicionales o sustitutos de los descritos anteriormente. Es preferible que cuando se administre el compuesto, este aporte propiedades terapéuticas, profilácticas o ambas. La preparación de dichos compuestos se puede hacer usando los métodos rutinarios de la técnica y en cualquiera de las formas, ya sean soluciones líquidas,
- 30 suspensiones o emulsiones, o cualquier forma sólida adecuada para su disolución en un líquido antes de la ingestión. Las técnicas de formulación y administración de polipéptidos y proteínas se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición. Por medio de estos procedimientos, cualquier persona no experta puede usar las inmunoadhesinas de la invención con éxito sin realizar experimentos indebidos.
- 35 Las vías de administración
- Las vías de administración adecuadas para la invención pueden ser por ejemplo: vía oral, nasal, por inhalación, intraocular, faringeal, bronquial, transmucosa, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o intestinal. Por otra parte, también se puede administrar el compuesto de manera localizada, por ejemplo, por inyección u otra aplicación del compuesto sobre un lugar de acción preferido.
- 40 Las formulaciones
- Los compuestos farmacéuticos de la presente invención se pueden fabricar por medios ya conocidos, como por ejemplo, procesos de mezclado convencional, disolución, granulación, fabricación de grageas, suspensión, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Se pueden utilizar uno o más agentes transportadores fisiológicamente válidos, que contengan excipientes y/u otros componentes auxiliares, para favorecer el
- 45 procesamiento de los principios activos en la preparación farmacéutica. La fórmula adecuada dependerá de la vía de administración escogida.
- En el caso de las preparaciones inyectables, los agentes de la invención se pueden formular como soluciones acuosas, preferiblemente soluciones tamponadas fisiológicamente compatibles, como la solución de Hanks, la solución de Ringer o una solución salina tamponada.
- 50 En el caso de una administración transmucosa, se usan agentes penetrantes adecuados para atravesar la barrera. Estos agentes penetrantes son conocidos de la técnica.
- En el caso de la administración por vía oral, la formulación se hará fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables que ya son conocidos en la técnica. Estos vehículos permiten que los compuestos de la invención se puedan formular en forma de comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, formas
- 55 líquidas, geles, jarabes, soluciones acuosas, suspensiones y similares, administrados por vía oral para el tratamiento a pacientes. Los vehículos adecuados contienen excipientes, tales como azúcares (lactosa, sucrosa, manitol y/o sorbitol) o preparaciones de celulosa (almidón de maíz, de trigo, de arroz, de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP)). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes como la polivinilpirrolidona sintética, el agar o el ácido alginico, o una sal como el alginato sódico.
- 60

- 5 Las grageas tienen un recubrimiento adecuado, para el que se utilizan soluciones concentradas de azúcar que pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, geles carbómicos, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones lacquer y solventes orgánicos adecuados, o mezclas de solventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de las píldoras o grageas para su identificación o bien para marcar diferentes combinaciones de las dosis del ingrediente activo.
- 10 Las composiciones farmacéuticas para su administración por vía oral son cápsulas rígidas de gelatina y cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y de un plastificante, como el glicerol o el sorbitol. Las cápsulas rígidas pueden contener principios activos en la mezcla con excipientes como la lactosa, aglutinantes como los almidones y/o lubricantes como el talco o el estearato de magnesio y, opcionalmente, también estabilizadores. En las cápsulas blandas, los principios activos deben ir disueltos o en suspensión en líquidos adecuados, como aceites pastosos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además también se pueden añadir estabilizadores. Todas las formulaciones para su administración por vía oral se deben presentar en dosis adecuadas para su correcta administración.

Para la administración bucal, los componentes pueden adquirir la forma de comprimidos o de pastillas, formulados de manera convencional o bajo forma de un gel hidrosoluble.

- 20 Para la administración por inhalación, los componentes indicados en la presente invención deben administrarse por medio de un aerosol en spray bajo la forma de inhaladores presurizados de dosis medidas o nebulizadores, utilizando un propelente apropiado, como por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases adecuados. En el caso de aerosoles presurizados, una válvula deberá liberar una dosis unitaria previamente medida. Las cápsulas y los cartuchos, por ejemplo de gelatina, de los inhaladores o de los insufladores, pueden contener un polvo mezcla del componente y un polvo de base adecuado, como la lactosa o el almidón.

Por otra parte, el principio activo puede ser en polvo y habrá que reconstituirlo con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes de su uso.

- 30 Además, las composiciones también se pueden formular en preparaciones depot. Estas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por medio de implantes (ya sean subcutáneos o intramusculares) o por inyecciones intramusculares. Así pues, por ejemplo, las composiciones se pueden formular con excipientes poliméricos o hidrofóbicos (como una emulsión en un aceite válido), con resinas de intercambio iónico o con pequeñas cantidades de derivados solubles.

- 35 Además, las composiciones serán administradas mediante un sistema de liberación prolongada, como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contengan un agente terapéutico. Se han establecido varias composiciones de liberación prolongada que son conocidas por personas expertas en la técnica. Las cápsulas de liberación prolongada, en función de su naturaleza química, pueden liberar la composición por un período desde unas semanas hasta 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y de la estabilidad biológica del reagenente terapéutico, se pueden utilizar estrategias adicionales para la estabilización protéica.

- 40 Las composiciones farmacéuticas también pueden contener sólidos, vehículos alfa-gel o excipientes. Como ejemplo de estos vehículos o excipientes, se mencionan, aunque no se limita a ellos, el carbonato de calcio, el fosfato de calcio, varios azúcares, almidones, derivados de la celulosa, la gelatina, y polímeros tales como los polietilenglicoles.

- Se pueden formar sales compatibles a nivel farmacéutico con muchos ácidos, como el clorhídrico, el sulfúrico, el acético, el láctico, el tartárico, el málico, el succínico, el cítrico, etc. Las sales suelen ser solventes y son las formas base correspondientes. En las disoluciones, la manipulación del pH se realiza de manera habitual para optimizar las propiedades deseadas.

Establecer dosis efectivas y regímenes de dosificación

- Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso de la presente invención deben contener cantidades efectivas de los principios activos para conseguir el objetivo deseado, ya sean objetivos terapéuticos o profilácticos.
- 50 Una cantidad efectiva, desde el punto de vista farmacéutico, implica que la cantidad del compuesto debe ser efectiva para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad, o para prolongar la vida del sujeto que se está tratando. Las personas expertas en la técnica podrán determinar cuál es la cantidad efectiva desde el punto de vista farmacéutico. Normalmente, se considera una cantidad diaria de entre 0,5 pg/kg y 500 g/kg, con dosis individuales que suelen contener entre 1 y varios nanogramos de inmunoadhesina.

- 55 Para cualquiera de los ingredientes usados en los métodos de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se estima inicialmente mediante ensayos de cultivo celular. Por ejemplo, se administran diferentes dosis a distintos animales o cultivos celulares y se compara su efecto. De este modo, se pueden identificar los rangos de concentraciones deseadas y preparar y administrar así dichas cantidades. La optimización es un proceso rutinario para una persona no experta en la técnica.

5 Una persona experta, además de tener en cuenta la efectividad farmacéutica, también considera la toxicidad con respecto a los procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en experimentos con mamíferos, como por ejemplo, para establecer la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED_{50} (la dosis terapéutica efectiva para el 50% de la población). La relación entre los efectos tóxico y terapéutico es lo que se conoce como índice terapéutico y se expresa como una proporción entre la DL_{50} y la ED_{50} . Los compuestos preferidos son los que muestran altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos en los ensayos con cultivos celulares y en los estudios con animales se usan para establecer un rango de dosis para los humanos. La dosificación de dichos compuestos se establece, preferiblemente, dentro de un rango de concentraciones que incluya la ED_{50} a baja toxicidad o a ninguna. La dosificación puede variar, dentro de este rango, en función de las dosis unitarias utilizadas y la vía de administración. El médico podrá establecer la formulación exacta, la vía de administración y la dosis en función de la condición de cada paciente. (Véase, p. ej., Fingl et al., (1975), en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, cap. 1, p. 1).

La dosis y la frecuencia de administración se pueden ajustar para mantener los valores plasmáticos del receptor químico de toxina o de la inmunoadhesina y así, aportar un efecto farmacéutico, bien sea terapéutico o profiláctico. La concentración mínima eficaz (CME) podrá variar en cada formulación, pero se podrá establecer partiendo de datos *in vitro* y/o *in vivo*. Las dosis necesarias para obtener la CME dependen de las características de cada individuo y de la vía de administración. Sin embargo, los ensayos como los que se describen en el presente documento, se pueden utilizar para determinar las concentraciones plasmáticas, que posteriormente se podrán optimizar en lo que respecta a la cantidad y a la formulación.

Los rangos de dosis se pueden establecer también teniendo como referencia el valor de la CME. Las composiciones se pueden administrar usando un régimen que mantenga los valores plasmáticos por encima de la CME durante el 10-90% del tiempo, durante el 30-90% del tiempo, o preferiblemente, durante el 50-90% del tiempo.

Si se desea, la presentación del compuesto puede ser en forma de un dispensador que contenga una o más dosis unitarias del principio activo. El acondicionamiento debe estar formado por una lámina de metal o plástico, como por ejemplo un blíster. El dispositivo o dispensador debe ir acompañado de las instrucciones de administración. El dispensador también debe ir acompañado de una nota, adherida al envase y prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de fármacos. Dicha nota reflejará la aprobación de esa agencia en lo que respecta a la forma de la inmunoadhesina para su administración en humanos y en animales. En la nota debe incluirse una etiqueta que indique la aprobación, por ejemplo, de la U.S. Food and Drug Administration para la prescripción de fármacos, en el caso de los Estados Unidos, o bien debe incluir el inserto indicando que el producto ha sido aprobado. Las composiciones que contienen un ingrediente de la invención, formuladas de un modo farmacéuticamente compatible, también se pueden preparar, disponer en un envase adecuado y etiquetar para el tratamiento de una condición indicada, como por ejemplo, para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad mediada por las moléculas de receptor de proteína de un organismo/paciente hospedador.

Métodos de tratamiento y prevención de la infección

A un paciente que necesite un tratamiento, ya sea terapéutico o profiláctico, con los receptores químicos de toxina/inmunoadhesinas de la invención (por ejemplo, contra una infección por carbunco) se le puede administrar una cantidad eficaz, desde el punto de vista farmacéutico, de los receptores químicos de toxina/inmunoadhesina deseados, preferiblemente, de una composición farmacéutica establecida, producida y administrada según descrito anteriormente. Estas formulaciones y formas de presentación pueden variar enormemente. A continuación se describen los procedimientos preliminares que se pueden utilizar para deducir las cantidades eficaces y la toxicidad, y que además se pueden usar para establecer los parámetros y los regímenes terapéuticos y profilácticos, tanto en humanos como en animales. Estos procedimientos son meramente ilustrativos y no se deben limitar a la invención. Además, son procedimientos rutinarios para una persona no experta en la técnica.

Capacidad del receptor químico de toxina/inmunoadhesina de reducir la infectividad en humanos: estudio sobre la escala de tolerancia a dosis

Se deben probar los receptores químicos de toxina/inmunoadhesinas de la presente invención, por ejemplo, haciendo estudios aleatorios controlados para determinar el efecto según la vía de administración (intravenosa o intramuscular en caso de infección). También se pueden usar otras vías de administración. Existen varios estudios que se pueden utilizar para monitorizar los efectos. Mediante estos estudios se puede evaluar en qué medida, los receptores químicos de toxina/inmunoadhesinas que se administren a los pacientes pueden tratar o prevenir la infección. Por ejemplo, se puede observar a sujetos infectados, o no infectados pero expuestos a la infección, a los que se les hayan administrado los receptores químicos de toxina/inmunoadhesinas y evaluarlos, después de un tiempo, para valorar la progresión de la enfermedad en comparación con sujetos similares infectados o expuestos a la infección pero a los que no se les ha tratado.

Los receptores químicos de toxina/inmunoadhesinas de la presente invención, se pueden fabricar en forma de solución salina tamponada, con cantidades variables de los receptores químicos de toxina/inmunoadhesinas, y administrarse al paciente en varios intervalos. Se harán estudios con dosis únicas ascendentes y con dosis múltiples ascendentes para evaluar la seguridad de la inmunoadhesina. En cada caso, se evaluará a uno o más sujetos para

- 5 cada valor de dosificación; a algunos se les administrará la inmunoadhesina y a uno o varios, un placebo. En ambos estudios se evaluarán los valores de las dosis múltiples. Los valores de las dosis pueden variar, pero normalmente se encuentran en rangos de nanogramo a gramo.

Las dosis se pueden administrar en un plazo de segundos, minutos, horas, semanas y meses, y se evalúa la toxicidad y el efecto farmacológico.

- 10 Mediante, por ejemplo, exámenes visuales de la mucosa nasal en busca de signos de irritación o inflamación, se evaluarán la seguridad y la toxicidad. Según los métodos rutinarios, se deben hacer estudios de toxicidad de la sangre usando ensayos de sensibilidad, como ELISA, para establecer varios componentes sanguíneos, entre los que se incluyen cantidades plasmáticas de inmunoadhesinas y rinovirus. También se deberían realizar, según los métodos rutinarios, pruebas de lavado nasal.
- 15 Para determinar la eficacia y la toxicidad previstas para los tiempos, en pacientes individuales y/o en poblaciones paciente-receptor, se deben usar análisis y cálculos estadísticos rutinarios.

- Si, por motivos éticos, el patógeno alcanzado por la proteína quimérica de receptor de toxina, como la bacteria del carbunco o sus esporas, no se puede administrar a sujetos humanos en un ensayo clínico controlado, la eficacia de la dosis proyectada sobre seres humanos se puede determinar experimentalmente en especies animales adecuadas, como por ejemplo, en primates expuestos a la bacteria del carbunco o a sus esporas. La dosis eficaz se puede establecer en función de la supervivencia de los animales tratados y controlados con varias concentraciones y por varias vías de administración de la proteína quimérica de receptor de toxina. Se toman muestras de sangre, moco y/o tejidos de los sujetos para determinar la farmacocinética y la farmacodinámica de la proteína quimérica del receptor de la toxina que se ha administrado. Partiendo de estos datos, también se establecen la concentración mínima eficaz y la vía de administración protectora de la proteína quimérica del receptor de toxina. Para establecer la concentración mínima eficaz en sujetos humanos, se administran, a hembras y varones normales, dosis de la proteína quimérica de receptor de toxina, por la misma vía de administración que se concluyó efectiva en el estudio clínico sobre sujetos animales que se describió anteriormente, y se les toman muestras de sangre, moco y tejidos. La concentración de la proteína quimérica de receptor de toxina administrada al sujeto humano se puede ajustar para obtener la misma concentración que se concluyó eficaz o protectora en las pruebas y muestras con animales.

- Las directrices para ensayos sobre animales y humanos, el establecimiento de productos seguros y eficaces para el tratamiento y/o la prevención de la exposición a patógenos como el carbunco, la toxina botulínica, la tularemia y similares, han sido promulgadas por la United States Food and Drug Administration y están a disposición del público en publicaciones como el Registro Federal: 31 de Mayo de 2002 (volumen 67, número 105), Rules and Regulations, Página 37988-37998. Esta regulación está disponible mediante acceso electrónico al Registro Federal www.access.gpo.gov y se puede encontrar en el Código de Reglamentos Federales, Food and Drug Administration, 21, CFR, partes 314 y 601.

Los siguientes ejemplos ilustran diversos aspectos y realizaciones de la invención descrita. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención reivindicada.

40 Ejemplos

Ejemplo 1: La construcción de los casetes de expresión de la inmunoadhesina ICAM-1 (no pertenece a la invención)

Mediante la clonación por RCP se preparó un vector que codifica para los dominios extracelulares D1 a D5 de ICAM-1. En concreto, se amplificó un fragmento con cinco regiones Ig extracelulares de la ICAM-1 en el plásmido pCDICl-5D/IgA (Martin, et al. J. Virol. 67:3561-8, (1993)) usando los siguientes cebadores de oligonucleótidos:

- 45 5' -TCTGTTCCCAGGAAGTAGTTTGGCACAGACATC (SEC ID N.º: 6) TGTGTCCCCCTCAAAGTC - 3'.
- 5' - CATAACGGGGACTAGTCACATTACGGTCACCT (SEC ID N.º: 7)
- CGCGG-3'

- Estos dos cebadores fueron diseñados para introducir sitios SpeI en los extremos 5' y 3' del fragmento purificado mediante RCP (nucleótidos subrayados). Se realizó una RCP con una polimerasa Pfu (Stratagene) para reducir la acumulación de errores. El fragmento obtenido por RCP fue clonado dentro del vector PCR-Script (Stratagene) y secuenciado antes de unirse a los casetes de IgA2 humanos (con y sin SEKDEL (SEC ID N.º: 4) en el grupo carboxilo-terminal).

- Se desarrollaron construcciones génicas para expresar en plantas la cadena J, el componente secretor y una cadena pesada de IgA2 humanos. Se creó un vector de expresión de cadena pesada, llamado pSSpHuA2 (Véase FIG. 1). Este contiene una secuencia que codifica para un péptido señal de legúmina de alubia (Baumlein et al., Nucleic Acids Res. 14 (6), 2707-2720 (1986)). La secuencia de legúmina de alubia se puede ver en el GenBank, bajo el número X03677, y la secuencia del péptido señal de la legúmina de alubia tiene el número de SEC ID N.º: 10 (Véase también FIG. 8), así como la región constante de IgA2m(2) con espacios SpeI y SacI en medio, y el

- 5 promotor SuperMas para impulsar la expresión de un péptido señal y las regiones constantes de la cadena pesada de la IgA2m(2) humana.

Los ADN que codifican para los cinco primeros dominios de la ICAM-1 humana y para el dominio Fc de la IgA2m(2) humana se unieron a un casete de expresión de planta para hacer un constructo de expresión de la molécula quimérica de ICAM-1, tal y como se muestra en la FIG. 2A. Todo esto se hizo mediante la clonación del fragmento

10 que codifica para los cinco dominios extracelulares de ICAM-1, dentro del vector pSSPHuA2, para generar pSSPICAMHuA2. Los sitios de restricción adecuados (5' SpeI y 3' SpeI) permitieron que el fragmento amplificado se insertara entre el péptido señal y el dominio C-alfa-1. En el constructo resultante, la expresión de la molécula quimérica ICAM-1 está bajo el control del promotor SuperMas (Ni et. al., 1995) y de la secuencia terminadora nos, en el extremo 3'.

- 15 El constructo de la molécula quimérica ICAM-1 resultante no tiene regiones variables. Tras la transformación del mRNA, se cree que la escisión del péptido señal depositará la unión de la cadena pesada de la ICAM-1 dentro del retículo endoplasmático (RE) de la célula de planta. Se añade ADN que codifica para una señal de retención a RE (RSEKDEL, SEC ID N.º: 5) al extremo 3' de la cadena pesada con el fin de impulsar el nivel de expresión del constructo. La secuencia de aminoácidos SEKDEL (SEC ID N.º: 4) es la secuencia señal de consenso para la
- 20 retención de proteínas en el retículo endoplasmático de las células de plantas. Esta secuencia se muestra para mejorar los valores de acumulación de anticuerpos en plantas (Schouten et al., Plant Molecular Biology 30:781-793 (1996)). En la FIG. 2B se muestra la secuencia de aminoácidos del constructo de la molécula quimérica ICAM-1. Antes de usarlos para el bombardeo de partículas, se verifican tanto la secuencia de ADN como el marco transformador del constructo.
- 25 Se ha observado recientemente que la unión de la cadena J con la IgA tiene lugar en el aparato de Golgi (Yoo et al., J. Biol. Chem. 274:33771-33777 (1999)), y que las construcciones de la cadena pesada sin SEKDEL (SEC ID N.º: 4) también suceden allí. El fragmento de ICAM-1 se clona dentro de un casete de expresión con el dominio constante de IgA2m(2) sin SEKDEL (SEC ID N.º: 4).

Ejemplo 2: La expresión en plantas de la inmuno adhesina ICAM-1 asociada (no pertenece a la invención)

- 30 A. Los vectores de expresión de la inmuno adhesina

El plásmido pSSPICAMHuA2 [SEC ID N.º: 9 y FIG. 8A] tiene una longitud de 6313 bp. Los nucleótidos 49-1165 representan al Superpromotor (Ni et al., Plant Journal 7:661 -676, (1995)). Los nucleótidos 1166-3662 contienen una secuencia que codifica para un híbrido constante de ICAM-1 humana/IgA2m(2) humana, con secuencias de enlace. Se añade (nt 1186-1192) una secuencia Kozak (Kozak, Cell 44(2):283 -92 (1986)) para mejorar la iniciación de la

35 transformación y el péptido señal de legúmina de alubia (nt 1189 1257; Bäumlein et al., Nucleic Acids Res. 14 (6):2707-2720 (1986)). La secuencia de la región constante de IgA2m(2) humana (nt 3663-3633), ya se ha publicado anteriormente (Chintalacharuvu et al., J. Imm. 152:5299-5304, 1994). Al final de la cadena pesada (nt 3634-3654) se añade una secuencia que codifica para la señal de retención SEKDEL [SEC ID N.º: 4] a retículo endoplasmático. De la síntesis de nopalina en el extremo 3' derivan los nucleótidos 3663-3933 (señal de terminación y poliadenilación; Depicker et al., 1982). El resto del plásmido se deriva del vector pSP72 (Promega).

- 40 El plásmido pSHuJ (FIG. 8C) tiene una longitud de 4283 bp. Los nucleótidos 14-1136 representan al Superpromotor (Ni et al., Plant Journal 7:661 -676, (1995)) y los nucleótidos 1137-1648 se muestran en la FIG. 8 [SEC ID N.º: 1] y constituyen una secuencia que codifica para la cadena J humana que contiene el péptido señal nativo (Max and Korsmeyer, J Imm. 152:5299-5304, 1985) junto con las secuencias de unión. Se incluye (nt 1162-1168) una
- 45 secuencia Kozak (Kozak, Cell 44(2):283-92, 1986) para mejorar la iniciación de la traducción. De la síntesis de nopalina en el extremo 3' derivan los nucleótidos 1649-1902 (señal de terminación y poliadenilación; Depicker et al., J Mol Appl Genet 1(6):561-73 (1982)). El resto del plásmido se deriva del vector pSP72 (Promega).

- El plásmido pSHuSC (FIG. 8D) tiene una longitud de 5650 bp. Los nucleótidos 13-1136 derivan del Superpromotor (Ni et al., Plant Journal 7:661-676 (1995)) y los nucleótidos 1137-2981 constituyen una secuencia que codifica para el componente secretor humano que contiene el péptido señal natural (Krajci et al., Biochem and Biophys. Res. Comm 158:783, (1994)) junto con secuencias de ligación [SEC ID N.º: 12]. Se incluye (nt 1151-1157) una secuencia
- 50 Kozak (Kozak, Cell 44 (2):283-92, 1986) para mejorar la iniciación de la transformación. De la síntesis de nopalina en el extremo 3' derivan los nucleótidos 2982-3236 y proporcionan una señal de terminación y poliadenilación, según se describe en Depicker et al., J Mol Appl Genet 1 (6):561-73 (1982)). El resto del plásmido se deriva del vector pSP72 (Promega).

- El plásmido pBMSP-1 (SEC ID N.º: 13 y FIG. 8E) procede de pGPTV-KAN. Becker et al., en Plant Molecular Biology 20, 1195-1197 (1992), describen nuevos vectores binarios de plantas con marcadores seleccionables, situados en el
- 55 borde izquierdo del ADN-T, y secuencias por fuera de los bordes izquierdo y derecho. Los nucleótidos 18-187 de pBMSP-1 representan el borde derecho del ADN-T y los nucleótidos 1811-775 representan el promotor SuperMas. Los nucleótidos 2393-2663 representan el promotor de la nopalina sintasa (Depicker et al., J Mol Appl Genet 1(6):561 -73, 1982); los nucleótidos 2698-3492 codifican para el gen NPTII (confiriéndole resistencia a la kanamicina), y los nucleótidos 3511-3733 son la señal de poliadenilación del gen 7 de *A. tumefaciens* (Gielen et al., Embo J 3:835-46,

- 5 1984). Los nucleótidos que codifican al gen NPTII y los nucleótidos 4317-4464 representan el borde izquierdo del ADN-T.

El plásmido pBMSP-1 spJSC [SEC ID N.º: 14 y FIG. 8F] es un derivado de pBMSP, que contiene J y SC bajo el control del Superpromotor. En este plásmido, los nucleótidos 1-149 representan el borde izquierdo del ADN-T. Los nucleótidos 955-733 son la señal de poliadenilación del gen *tumefaciens*, los nucleótidos 1768-976 que codifican para el gen NPTII (aportándole resistencia a la kanamicina) y los nucleótidos 2073-1803 representan el promotor de la nopalina sintasa. Los nucleótidos 2635-3768 representan el promotor SuperMas, los nucleótidos 3774-5595 codifican para el componente secretor humano y los nucleótidos 5603-5857 representan la señal de la poliadenilación nopalina-sintasa. Los nucleótidos 5880-6991 representan el promotor SuperMas, los nucleótidos 7007-7490 codifican para la cadena de unión humana y los nucleótidos 7504-7757 representan la señal de la poliadenilación nopalina-sintasa. Los nucleótidos 7886-8057 representan el borde izquierdo del ADN-T.

El plásmido pGPTV-HPT, que codifica para la enzima que confiere resistencia a la higromicina, es accesible comercialmente a través del Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Alemania). Lo describe Becker en Plant Molecular Biology 20, 1195-1197 (1992).

B. La transformación de las plantas y la expresión de la inmunoadhesina ICAM-1 en plantas

20 Los casetes de expresión descritos anteriormente se usaron para producir inmunoadhesina en plantas. Se bombardean tejidos de hoja de tabaco (*N. tabacum cv Xanthi*) con los plásmidos pSSPICAMHuA2, pSHuJ, pSHuSC y pBMSP-1 y se seleccionan los microcallos transformados, en agar nutritivo, en presencia de kanamicina. Cada microcallo, indicativo de la transformación de casos independientes, se separa del tejido precursor y se cultiva en agar nutritivo en presencia de kanamicina.

25 Se examinan los tejidos de los callos para observar la expresión del transgén. Se observa que el callo n.º 7132 expresa una inmunoadhesina ICAM-1 quimérica y una cadena J por inmunoblot y por RCP (datos no mostrados). Este callo no muestra ADN codificado a SC. El callo se da bien en el cultivo y, una vez se acumula suficiente masa, el n.º 7132 se bombardea de nuevo, esta vez con dos de los plásmidos descritos anteriormente, pBMSP-1 SpJSC, que contiene casetes de expresión para la cadena J y el SC, y pGPTV-HPT, que contiene un casete de expresión para el gen hpt I y que aporta resistencia a la higromicina. Después de un período de selección y crecimiento en agar nutritivo, se identifican varios transformantes independientes, por medio de inmunoblot, que expresan la molécula quimérica de ICAM-1, la cadena J y el SC en varias fases de ligación.

La FIG. 3 muestra la expresión de la molécula quimérica de ICAM-1 en callo de tabaco transformado de forma independiente. La FIG. 3A muestra inmunoblots de geles de SDS-PAGE no reductora, cuyas muestras, que contienen diferentes callos de tabaco transformados (C) y extractos acuosos (Aq), migran y prueban la presencia de ICAM humana. La solubilidad de la inmunoadhesina nos asegura que la extracción se podría realizar fácilmente y la similitud de las señales nos lleva a creer en la reproducibilidad de la expresión. La FIG. 3B muestra inmunoblots de geles de SDS-PAGE no reductora que contienen diferentes fracciones de inmunoadhesina parcialmente purificada del callo Rhi107-11. Las transferencias se sondearon con anticuerpos frente a la ICAM humana (~ICAM), cadena pesada de la IgA humana (~α), componente secretor humano (~SC) y cadena J humana (~J). En segundo lugar, se usaron anticuerpos conjugados con enzimas según necesidad para etiquetar las bandas inmunopositivas con fosfatasa alcalina. La especificidad del inmunoblotting se comprueba por un fallo en la detección de bandas inmunopositivas en extractos de callos no expresables (no se muestra). El PM esperado para una molécula quimérica de ICAM-1 dimerizada, sin glicosilación, es de 173.318; es probable que esta forma esté presente en la banda que migra justo por debajo de los marcadores de 250 kD, pues es inmunopositiva para la ICAM-1 y la cadena pesada. Esta banda también es inmunopositiva para el SC (PM total esperado de ~248 kD) pero no para la cadena J, algo inesperado, en cierto modo, teniendo en cuenta la vía canónica para la asociación de la SIgA, lo que implica dos tipos celulares (para mamíferos) y necesita de la presencia de cadena J antes de asociarse al SC. Una inmunoadhesina tetramérica, que contenga una sola molécula de cadena J y una sola molécula de SC, tiene un PM esperado de ~440 kD, previo a la glicosilación. Hay evidencias de varias especies con pesos moleculares muy por encima de los 200 kD, inmunopositivas según el método de las cuatro puntas.

Para producir transformantes estables, tanto en plantas como en animales, se usa el bombardeo con microproyectiles impregnados de ADN (revisión de Sanford et al., Meth. Enz. 217:483-509, 1993). Se realizan transformaciones mediadas por partículas con los vectores que codifican para la inmunoadhesina de la presente invención, usándose el acelerador de partículas PDS-1000/He, fabricado por Bio-Rad. El acelerador de partículas PDS-1000/He utiliza presión por helio para acelerar las micropartículas impregnadas de ADN hacia las células diana. Su naturaleza física la convierte en una técnica muy versátil y fácil de usar. Hemos transformado con éxito el tabaco con los cuatro componentes de la IgA secretora simultáneamente.

60 El procedimiento biolístico básico se realizó como se indica a continuación: se preparó una suspensión de microproyectiles mezclando 60 mg de partículas en 1 ml de etanol absoluto. Se procedió al agitado; se eliminaron 25-50 µl y se añadieron a un tubo estéril microcentrifugador. Después de proceder al microcentrifugado durante 30 segundos, el etanol se eliminó y se volvió a suspender la resina en 1 ml de agua estéril, para posteriormente centrifugarla durante 5 minutos. Se retiró y la resina se volvió a suspender en 25-50 µl de una solución de ADN que

5 contiene una mezcla de ADN plasmídico, por lo general, aunque no siempre, en cantidades equimolares. La cantidad de plásmido añadida variaba entre 0,5 ng y 1 µg por preparación. Gradualmente se fueron añadiendo: 220 µl de agua estéril, 250 µl de 2,5M CaCl₂, y 50 µl de 0,1M espermidina. La mezcla se agitó durante al menos 10 minutos y, a continuación, se centrifugó durante otros 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el microproyectil de ADN se precipitó en 600 µl de etanol absoluto, se mezcló y centrifugó durante 1 minuto. El etanol se eliminó y la resina se volvió a suspender en 36 µl de etanol. Se aplicaron diez µl de una suspensión, lo más uniformemente posible, sobre el centro de una hoja Kapton (DuPont) para que el etanol se evaporase. El *macrocarrier* y el disco de ruptura se colocaron en la unidad. Bajo la pantalla de parada se colocó una placa petri con hojas de tabaco esterilizadas por filtración. A 28-29 mm Hg se evacuó la cámara y luego se bombardeó la diana de nuevo. El protocolo para el tabaco está optimizado, pero también para otras plantas, variando parámetros como la presión de He, la cantidad de partículas recubiertas, la distancia entre el *macrocarrier* y la pantalla, y la distancia de vuelo desde la pantalla de parada hasta el tejido.

Los casetes de expresión para moléculas quiméricas de ICAM-1 también se unieron a vectores binarios para ser usados en una transformación por *Agrobacterium*. Se introdujo un vector binario de *Agrobacterium*, diseñado para la expresión de la cadena J humana y el componente secretor humano, y conferir también resistencia a la kanamicina, en una cepa de *A. tumefaciens* LBA4404. La molécula quimérica ICAM/IgA de otro vector binario también se usó para transformar LBA4404. Cultivos de ambas cepas se dejaron incubar toda la noche y se usaron simultáneamente con hojas de tabaco, según el protocolo estándar (Horsch et al., Science 227:1229-1231, 1985).

Se siguió un protocolo estándar para la regeneración de discos de hojas de tabaco, tanto procedentes de bombardeo como de transformación por *Agrobacterium* (Horsch et al., Science 227:1229-1231, 1985). Dado que las plantas transformadas, regeneradas por bombardeo de tejido, suelen ser inactivadas después de la maduración, las plantas de tabaco transgénicas se transformaron por *Agrobacterium*, lo que implica una mayor expresión de plantas maduras.

Ejemplo 3: La purificación de la inmunoadhesina ICAM-1 asociada (no pertenece a la invención)

La inmunoadhesina expresada según el ejemplo 2 fue purificada. Para facilitar el desarrollo de los procesos de extracción, se cultivó una gran cantidad de callos. Un esquema de purificación parcial aportó una concentración estable, disponible en condiciones amortiguadoras variables, para la investigación de las ulteriores técnicas cromatográficas con las inmunoadhesinas (véase FIG. 3). Se extrajeron los callos con una licuadora, que estrujó el tejido entre las dos cuchillas de acero inoxidable, mientras se bañaba en una solución amortiguadora de citrato de sodio (0,6 M, pH 7,4) y urea (concentración final de 2 M). Se precipitó el jugo (~1 ml/g peso fresco), tras pasarlo por un filtro grueso de estopilla, con 0,67 volúmenes de sulfato de amonio saturado. Después de centrifugar y hacer una extracción cuidadosa, obtuvimos una resina verde, en un volumen pequeño de 50 mM de citrato sódico (pH 6,6) con un homogenizador Dounce. Tras un centrifugado adicional, se recogió un sobrenadante marrón claro y se purificó parcialmente, durante un intercambio de tampón en modo desalinizante, pasándolo por una columna Sephadex G-100. El intercambio de solución desalinizante/tampón amortiguador permitió la preparación de una concentración purificada parcialmente (~0,2 ml/g peso fresco de callo) en un tampón deseado; para la elución se utilizó la columna G-100 con 0,25 X de tampón de fosfato salino. Esta elución parece ser estable durante al menos 10 días a 2-8 °C.

Ejemplo 4: La inmunoadhesina ICAM-1 inhibe la infectividad por rinovirus humano (no pertenece a la invención)

Se demostró que la infectividad de las células por el rinovirus humano se inhibe por la acción de la inmunoadhesina preparada en el ejemplo 3. El extracto de callos preparado según el ejemplo 3 compitió con éxito para unir un anticuerpo monoclonal anti-ICAM a una ICAM-1 soluble. La FIG. 4 muestra los datos de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Para el ensayo, se revistieron placas de 96 pocillos con 0,25 µg/ml de ICAM-1 soluble. Los cuadrados representan la concentración creciente de sICAM y los círculos representan las cantidades crecientes de extracto de callo (fracción G-100 esterilizada por filtración) usada para competir con la ICAM adherida para una cantidad constante de un anticuerpo murino (ICAM antihumano). Después de lavar los recipientes, se detectó un anticuerpo murino adherente con un anticuerpo antimurino conjugado a la peroxidasa del rábano. La actividad de la enzima adherente fue medida a 490 nm, con ortofenilendiamina como sustrato. Los datos (cuadrados, sICAM; círculos, extracto) se describen por medio de curvas siginoides de la forma $OD_{490} = y_0 + a/[1 + e^{-\{(x-x_0)/b\}}]$, donde $a = y$ máx., $y_0 = y$ mín., $b =$ la inclinación de la parte de la curva que cambia rápidamente y $x_0 =$ al valor de x al 50% del nivel de respuesta. Respecto a la ICAM-1 soluble, el extracto de inmunoadhesina sobre el que se hace el ensayo contiene el equivalente de 250 µg ICAM/ml; esto es una estimación debido a los efectos de avidez esperados de los compuestos diméricos y tetraméricos de las fusiones de cadenas pesadas de ICAM-1. Así pues, ELISA demostró que la inmunoadhesina compete con la ICAM-1 soluble para unirse a un anticuerpo monoclonal anti-ICAM.

La competitividad de ELISA permite hacer la valoración cuantitativa de la recuperación de la actividad, comparando las cantidades normalizadas de varias fracciones necesarias para obtener una respuesta del 50%. Después de la purificación, expresamos la concentración de la preparación de inmunoadhesina como una dilución recíproca, o lo que es lo mismo, el número de mililitros en los que se debe diluir un miligramo de inmunoadhesina para obtener una respuesta del 50%. ELISA facilitará el desarrollo del proceso de purificación para la inmunoadhesina.

5 Un ensayo de efecto citopático (ECP) demostró la capacidad especial de la inmunoadhesina parcialmente purificada para inhibir la infectividad del rinovirus humano en las células humanas (FIG. 5). Se preincubó el serotipo del rinovirus RVH-39 con la ICAM-1 humana, con una composición ICAM/IgA (aportada por el Dr. Tim Springer) o con extractos de callo que expresan nuestra inmunoadhesina ICAM-1/SIgA u otro anticuerpo diferente, para
10 posteriormente colocar en una placa cada una de las mezclas con células HeLa S3 a 33 °C. Tres días después, se fijaron las células viables y se tiñeron con una solución metanólica cristal violeta; una densidad óptica a 570 nm facilita el cálculo proporcional de la viabilidad celular.

Dos extractos derivados de Rhi 107-11 y que contienen la inmunoadhesina, inhiben claramente la capacidad del virus para infectar y matar las células HeLa (FIG. 5A, triángulos hacia arriba y hacia abajo). Como los extractos solo
15 estaban purificados parcialmente, también hicimos ensayos con un extracto preparado de la misma manera pero que contenía IgA2m(2) humana dirigida contra la doxorubicina, un agente utilizado en quimioterapia. Dicho extracto, que tenía una inmunoglobulina similar con una especificidad de unión no relacionada, no pudo inhibir la infectividad del rinovirus y demostró que la expresión de la unión ICAM-1/cadena pesada aporta especificidad a la inhibición. El ensayo ECP demostró, tal y como se esperaba, la capacidad diferencial de la ICAM-1 soluble y un ICI-5/IgA (Martin
20 et al., 1993) para inhibir la infectividad del virus (FIG. 5B). En la FIG. 5B se muestra el rango de expansión del IC₅₀ para la ICAM-1 soluble (1,35 µg/ml) y del IC1-5/IgA (0,12 µg/ml; 11,3 veces menos).

Ejemplo 5: Producción y purificación de las inmunoadhesinas y estudios clínicos y toxicológicos (no pertenece a la invención)

La producción de suficiente inmunoadhesina para las necesidades clínicas y toxicológicas propuestas se realiza por
25 medio de la elaboración de plantas de tabaco transgénicas. Las plantas transgénicas que expresan inmunoadhesina (sin señal de retención a RE) se generan por transformación mediada por *Agrobacterium*. Se prevé que la falta de señal de retención a RE mejore la unión, pues la SIgA naciente se procesa por todo el aparato de Golgi, incluyendo la red del trans Golgi, donde el SC se une mediante enlaces covalentes a la dIgA, tal y como se sugiere desde los experimentos de pulso y caza (Chintalacharuvu & Morrison, Immunotechnology 4:165-174, (1999)). Como la transformación mediada por *Agrobacterium* es mucho más probable que genere plantas con niveles consistentes de
30 expresión transgénica, también es probable que la descendencia de estas plantas se use para producir inmunoadhesina de uso clínico.

Con el fin de maximizar los niveles de expresión y crear una auténtica línea pura, es conveniente crear plantas homocigotas. La mayor producción de plantas (de la generación T0) puede autofecundarse en el invernadero antes
35 de que la semilla se recoja. Se espera que una cuarta parte de las plantas T1 sean homocigotas. Se cultivan en el invernadero y las muestras de las semillas de varias plantas germinan por separador en un medio con kanamicina. Se prevé que toda la descendencia (T2) de las plantas homocigotas sea de color verde. Se prevé que sean blancos o amarillentos algunos de los descendientes de las plantas heterocigotas. La homocigotidad queda confirmada cruzando semillas salvajes y extractos de inmunoblot de los descendientes.

Durante una campaña de producción, se deben encajar continuamente la cosecha y el procesado, en especial
40 teniendo en cuenta que se pueden obtener múltiples cosechas de una sola plantación, por ejemplo, de las plantas que se cortan al nivel del suelo en una cosecha y vuelven a crecer para posteriores cosechas. Para desarrollar una escala de producción de inmunoadhesinas es importante decidir la cantidad necesaria de inmunoadhesina terminada, tener en cuenta los niveles de expresión (mg de inmunoadhesina presente/kg de peso fresco de tabaco), conocer la tasa de crecimiento de las plantas y el peso estimado de una planta media, y la producción total del
45 esquema de purificación (fijado en un 20%). Si se establece una necesidad total de 3 g de inmunoadhesina terminada, se necesitan 4 cosechas, cada una con una producción estimada de 1 g de inmunoadhesina terminada.

Se establece el espacio necesario para el cultivo de las plantas, teniendo en cuenta estos objetivos y parámetros y el número necesario de plantas. La FIG. 6 muestra una evaluación de las necesidades de producción para fabricar 1
50 g de inmunoadhesina terminada. En este diagrama, se ilustra el número de plantas necesarias para 1 g de inmunoadhesina, con un rendimiento del 20%, a niveles de expresión y peso de plantas esperados. A diferentes niveles de expresión de inmunoadhesina (mg/kg de peso fresco) y una recuperación global (ajustada al 20%), se puede determinar el peso de cada planta, y de esta manera el número total de plantas para un objetivo de producción específico (1 g/cosecha) contenido en una ventana (cuadro punteado) de posibilidades razonables. El número de plantas necesarias disminuye, inversamente, con el número especificado de periodos de crecimiento y
55 recrecimiento. La producción esperada de biomasa, que es en función del tiempo y de las condiciones de crecimiento, influye sobre el momento de cosechar y el periodo entre cosechas. Estos periodos de crecimiento se pueden ajustar a las realidades del programa de purificación, espaciando las fechas de plantación y cosechado. Por ejemplo, para obtener 1 g de inmunoadhesina terminada derivada de planta, con un nivel de expresión razonable de 100 mg de inmunoadhesina/kg de peso fresco, se necesitan 250 plantas, siempre y cuando se recojan a un peso de
60 200 g/planta (~80 días después de haber germinado). En esta escala, estas plantas requieren aproximadamente 10 m² de espacio de cultivo y se recogen dos veces en 150 días.

Procesar más de 50 kg de biomasa al mismo tiempo exige varias operaciones a gran escala que tienen su contrapartida en la industria de procesado de alimentos. En dicho proceso hay que hacer manejo de materiales a granel, reducción de tamaño, prensado y filtrado. Se utiliza una prensa Vincent y un sistema de filtración Durco para

- 5 procesar de manera eficiente estas cantidades. La fase de prensado conlleva el uso de un sencillo tampón de citrato sódico y urea. Estos componentes amortiguan el extracto, ayudan a prevenir la oxigenación de los compuestos fenólicos y de su unión a proteínas (Gegenheimer, *Methods in Enzymology* 182:174-193, 1990; Loomis, *Methods in Enzymology*, 31:528-544, 1974; Van Sumere et al., *The Chemistry and Biochemistry of Plant Proteins*, 1975) y garantizan la solubilidad de la inmunoadhesina durante la posterior precipitación ácida.
- 10 La filtración de lípidos ácido-insolubles y de proteínas (~90% del total) es seguida de una ultrafiltración del flujo tangencial para concentrar las inmunoadhesinas y eliminar las proteínas pequeñas, en concreto las fenólicas. La diafiltración facilita la eliminación de moléculas pequeñas y permite un intercambio de tampón en la preparación, para preservarlo durante un corto periodo de tiempo y posteriormente continuar con la cromatografía. Tanto la SP-sefarosa (que liga a pH 5,0 o inferior) como la Q-sefarosa (que liga a pH 5,5 o superior) están entre los intercambios
- 15 de iones que se pueden usar para filtrar la inmunoadhesina. Son fáciles de conseguir, escalables, robustas y tienen altas capacidades. En concreto, existen para formatos de cama expandida, lo que reduce la severidad de los pasos previos de filtración. La cromatografía de intercambio catiónico, más selectiva que la cromatografía de intercambio aniónico, se usa en primer lugar. La inmunoadhesina se purifica a partir de varias especies de proteínas potencialmente presentes, hasta el punto de que al menos el 95% de la proteína está en forma de ICAM-1/IgA, ICAM-1/dIgA o ICAM-1/SlgA, mientras que la presencia de dominios de ICAM-1 divalentes y tetravalentes son
- 20 críticos para la potente actividad antiviral. Se prueba la inmunoadhesina purificada para comprobar que tenga niveles aceptables de endotoxina, de alcaloides, como la nicotina, y de carga biológica. También se controlan los niveles de actividad (definidos por ELISA y ensayos ECP), la concentración proteica, el pH y la apariencia. Posteriormente, se determina la estabilidad de los lotes clínicos de inmunoadhesina para asegurar que los pacientes
- 25 reciben una inmunoadhesina potente. Se ha observado incluso, que los extractos purificados parcialmente son estables durante 10 días en condiciones de refrigeración. Se comprueba también la concentración y la potencia de la inmunoadhesina formulada clínicamente (en solución tamponada de fosfato salino) cuando se guarda a -20 °C, 2-8 °C y 37 °C durante un periodo de 3 a 6 meses.

Ejemplo 6: Las inmunoadhesinas tienen glicosilación específica de plantas (no pertenece a la invención)

- 30 Se analizan las inmunoadhesinas producidas para determinar el patrón de glicosilación presente. Cabanes-Macheteau et al., *Glicobiología* 9(4):365-372 (1999), demostró la presencia de varios restos de glicosilación, típica de plantas, en un constructo de anticuerpo expresado en planta. Sus métodos son usados para demostrar que las inmunoadhesinas que se produjeron según los ejemplos 1, 2 y 3 siguen un patrón de glicosilación específica de plantas. Esperamos que esta diversidad también sea una fuente de variabilidad para la inmunoadhesina. Si bien se
- 35 ha demostrado que los extractos crudos tienen actividad antiviral in vitro (no se muestran datos), la glicosilación como tal no parece afectar a la potencia. La N-glicosilación (la FIG. 2 muestra que, solo en la molécula quimérica ICAM-1, hay quince sitios potenciales) probablemente contribuye a la diversidad de bandas que se ven en los inmunoblots. Las preparaciones de inmunoadhesina son digeridas con N-glicosidasa A, antes de la transfección, mostrando que la diferencia en los patrones de bandas se rompe y genera bandas más pequeñas y discretas. De
- 40 este modo, las glicoformas se caracterizan inicialmente con geles de poliacrilamida reductora y no reductora. Además, las fracciones digeridas y pseudodigeridas se examinan con ensayos ECP y ELISA, demostrando el efecto de la N-glicosilación sobre la potencia y la concentración in vitro.

Ejemplo 7: La inmunoadhesina ICAM-1 inactiva el rinovirus humano (no pertenece a la invención)

- 45 La inmunoadhesina preparada según los ejemplos 1, 2 y 3 se lleva a cabo por su capacidad de inactivar el HRV porque se une al virus, bloquea su entrada e induce la formación de cápsidas virales vacías. Para medir la unión de la inmunoadhesina al HRV, se procede a incubar la inmunoadhesina con [³H]leucina etiquetada HRV-39 durante 30 minutos, para añadirla luego a células HeLa durante 1 h. Después del lavado, las células y el virus unido se separan gracias al Tritón X-100 y [³H] y se miden con un detector de centelleo.
- 50 Se compara la inactivación de HRV-39, por incubación con la inmunoadhesina, con la inactivación de HRV por sICAM-1. El HRV-39 no se inactiva directamente hasta que llega a un grado significativo (<0,5 log₁₀ reducción de infectividad), por incubación con sICAM-1 monomérico; sin embargo, la incubación con ICI-5D/IgA reduce la infectividad en aproximadamente 1,0 log₁₀ (Arruda et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1186-1191, 1992; Crump et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:1425-7, 1994). Con el fin de comprobar la capacidad de la
- 55 inmunoadhesina para inactivar el HRV-39, 106 dosis infectivas al 50% de tejido cultivado (TCID₅₀) de HRV-39 se incuban en un medio con concentración de sICAM-1 o inmunoadhesina igual a diez veces la IC₅₀ de cada molécula de ese virus, o en un medio estable, durante 1 h a 33 °C sobre una plataforma oscilante. Cada composición virus-inmunoadhesina o virus-medio se diluye luego en diez veces, y la concentración se determina en las células HeLa en placas de 96 pocillos.
- 60 El efecto de la inmunoadhesina sobre el HRV unido a las células hospedadoras se comprueba mediante inoculación de las células HeLa con el HRV-39 a MOI de 0,3 en presencia o ausencia de la inmunoadhesina. La absorbancia tiene lugar durante una hora a 4 °C, se lavan las células y el medio se sustituye, con o sin la inmunoadhesina. Se incuban las células durante diez horas a 33 °C (para que se pueda producir un turno de replicación) y se recogen los virus por medio de la congelación/descongelación de las células. El virus se concentra en las células HeLa.

- 5 El compuesto ICAM-IGA (IC1-5D/IgA) es más eficaz que el sICAM-1 para inducir cambios en la conformación del HRV, llegando incluso a formar partículas virales vacías y no infecciosas (Martin et al., J. Virol. 67:3561-8, 1993). Para examinar la capacidad de la inmunoadhesina producida conforme a los ejemplos 1, 2 y 3 para inducir cambios en la conformación de HRV que provoquen la liberación del ARN viral, la inmunoadhesina purificada se incubó con [³H] leucina etiquetada HRV-39 durante 30 minutos y luego se cubre el virus con un gradiente de sacarosa al 5-30%.
- 10 Después de proceder al centrifugado durante 90 minutos a 40.000 rpm, se recogen las fracciones, se miden [³H] y se valora su infectividad. (Se obtienen sedimentos intactos de HRV a 149S con un gradiente de sacarosa y cápsidas vacías sin sedimento de ARN a 75S (Martin et al., J. Virol. 67:3561-8,1993)). Debido a su valencia aumentada, se espera que la inmunoadhesina ICAM/SlgA sea más eficaz que la ICAM-IgA en lo que respecta a la inducción de partículas vacías no infecciosas.
- 15 El efecto inhibitorio de la inmunoadhesina purificada en un panel de serotipos principales y minoritarios de HRV (que no usa ICAM-1 como receptor) se examinará por medio del ensayo ECP. La capacidad de la ICAM-1 de inhibir la infección por HRV varía entre los aislados virales. Se ha demostrado (Crump, et al., Antimicrob. Agents Chemother. 38:1425-7, 1994) que la EC₅₀ para la sICAM-1 varía de 0,6 µg/ml a > 32 µg/ml cuando se experimenta sobre un panel de serotipos de receptores principales de HRV con células HeLa. Nuestro panel contiene nueve serotipos
- 20 principales (HRV-3, -13, -14, -16, -23, -39, -68, -73 y -80) y el serotipo minoritario HRV-1A.

Ejemplo 8: Estudios clínicos que demuestran la capacidad de la inmunoadhesina ICAM-1 de reducir la infectividad en los humanos: estudio sobre la escala de tolerancia a dosis (no pertenece a la invención)

- La inmunoadhesina de la presente invención se probó en dos ensayos controlados aleatoriamente para determinar el efecto de la administración intranasal de la inmunoadhesina en infección, la respuesta IL-8 y la enfermedad en
- 25 dos resfriados experimentales causados por rinovirus. Estos dos estudios evalúan la inmunoadhesina tomada por los sujetos antes o después de la inoculación del rinovirus. Los protocolos clínicos usados aquí se basan en protocolos usados previamente para evaluar la eficacia contra una infección por rinovirus de la molécula ICAM-1 soluble y recombinante (Turner, et al., JAMA 281:1797-804,1999).

A. Los sujetos

- 30 Los sujetos han sido seleccionados en comunidades universitarias de la Universidad de Virginia, Charlottesville. Es necesario que los sujetos gocen de buena salud, sean no fumadores y tengan edades comprendidas entre los 18 y 60 años. Se excluye a sujetos con un historial de enfermedades alérgicas o rinitis no alérgica, anatomía nasal o mucosa anormal, o que hubieran sufrido alguna infección del aparato respiratorio las dos semanas anteriores al estudio. También se excluye a mujeres embarazadas, en periodo de lactancia o que no estén tomando ningún
- 35 medicamento anticonceptivo. Para el estudio experimental de exposición al virus (véase a continuación fase I/II), es necesario que se pruebe la susceptibilidad de los sujetos al virus de estudio, mediante la concentración plasmática de anticuerpo neutralizante de 1:4 o menos para el virus, determinada 90 días antes del inicio del estudio.

B. Medicación del estudio

- La inmunoadhesina de la presente invención se formula en una solución tamponada de fosfato salino (PBS) a 2,6
- 40 mg/ml en spray. El placebo es una PBS y tiene una apariencia idéntica a la del compuesto activo. Las soluciones se administran usando un frasco equipado con una bomba de spray nasal de dosis medida. La bomba suministra 70 µl de la solución, que contiene 183 µg de la inmunoadhesina en cada aplicación. Se administran dos aplicaciones por cada orificio nasal, seis veces al día (en intervalos de 3 horas), siendo la dosis diaria total 4,4 mg. Esta es la misma dosis, en mg proteína/día, que se usó para la ICAM-1 soluble en el estudio de infección de la tremacamra (Turner et al., JAMA 281:1797-804, 1999). Un mol de inmunoadhesina tiene cerca del doble de masa que un mol de sICAM-1.
- 45 Sin embargo, teniendo en cuenta las diferencias de la actividad *in vitro* entre los compuestos sICAM-1 e ICAM/IgA, la inmunoadhesina es mucho más efectiva, en lo que respecta a la molaridad, que la sICAM-1. Por lo tanto, esta cantidad es un cálculo conservador sobre la cantidad necesaria. Esta es la dosis utilizada, salvo en el caso de que los estudios de escalada de dosis reflejen problemas con dicha dosis.

50 C. Diseño del estudio

- Se hacen estudios con dosis únicas ascendentes y con dosis múltiples ascendentes para evaluar la seguridad de la inmunoadhesina. En cada caso, se evalúa a tres sujetos para cada valor de dosificación; dos de ellos han recibido la inmunoadhesina y uno el placebo. En el estudio con dosis únicas ascendentes, se evalúan cuatro valores de dosis. La dosis individual más baja es la mitad de la dosis que se establecía en el estudio de exposición, y la dosis
- 55 individual más alta es el doble de la que se establecía en el estudio de exposición. Los valores de las dosis son como se indica a continuación: una aplicación en cada orificio nasal (366 µg en total), dos aplicaciones en cada orificio nasal (732 µg en total), tres aplicaciones en cada orificio nasal (1098 µg en total) y cuatro aplicaciones en cada orificio nasal (1464 µg en total).

- Se usan los mismos valores de dosis en los estudios de dosis múltiples ascendentes. Los sujetos reciben dosis cada tres horas (seis veces al día) durante cinco días. En ambos estudios, los sujetos son evaluados a la misma dosis, pudiendo alterarse el comienzo de cada uno de los niveles siguientes hasta que quede claro que no hay toxicidad aguda en el nivel anterior. A todos los sujetos se les administra una dosis única 21 días después de la primera dosis,
- 60

- 5 y posteriormente, a las seis semanas, como seguimiento (para determinar el anticuerpo sérico contra la inmunoadhesina).

A otro grupo de doce sujetos se les administra una dosis de dos aplicaciones en cada orificio nasal (732 µg en total), y se les hace un lavado nasal a las horas 1, 2, 4, 8 y 16 (a dos sujetos en cada una de estas horas). Los lavados se analizaron en Panorama Research mediante ELISA para calcular la semivida in vivo de la inmunoadhesina. La cantidad total de la inmunoadhesina que se debe usar en una escalada de dosis y en estudios de determinación de semivida (en un total de 28 sujetos) será de aproximadamente 270 mg.

D. Estudios de toxicidad

Además del registro rutinario de eventos adversos, la toxicidad de la inmunoadhesina se estudia de tres maneras. En primer lugar, antes de administrar la primera dosis y después de la última, los investigadores realizan un examen visual de la mucosa nasal, en concreto, buscan signos de irritación o de inflamación. Se anota cualquier cambio visible. En segundo lugar, se realizan estudios estándar de toxicidad en la sangre sobre las muestras recogidas antes del tratamiento y después de la última dosis, en los días 1, 4 y 8 (y 21 en los estudios de dosis múltiples ascendentes) del estudio. En tercer lugar, se guardan y congelan las muestras de suero para determinar si la inmunoadhesina es capaz de pasar, a través de la mucosa nasal, hasta la sangre. Esto se realiza de dos maneras. En primer lugar, mediante la técnica ELISA se mide la presencia de la inmunoadhesina en las muestras de suero. En este examen, los anticuerpos de IgA antihumana adsorbidos en las placas de microconcentración capturan cualquier inmunoadhesina que haya en el suero, y son detectados por un anticuerpo anti-ICAM. La sensibilidad de los exámenes se establece usando muestras de suero humano normal con concentraciones conocidas de la inmunoadhesina. Por otra parte, los anticuerpos anti-ICAM pueden ser adsorbidos en las placas para capturar la inmunoadhesina del suero que podría ser detectada por un anti-IgA. En segundo lugar, la presencia de la respuesta inmune a la inmunoadhesina se lleva a cabo con el método ELISA, que utiliza la inmunoadhesina adsorbida a las placas de microconcentración. Cualquier anticuerpo de antiinmunoadhesina del suero se une y es detectable con la IgG o la IgM antihumanas. Se comparan las muestras de suero previas y posteriores al tratamiento y cualquier cambio en la concentración es considerado una prueba de la absorción de la inmunoadhesina. En caso de encontrar pruebas positivas de los anticuerpos de antiinmunoadhesina, se realizan estudios para distinguir la actividad del anti-ICAM-1 y la del anti-IgA.

Se examina a los pacientes por un posible desarrollo de una reacción alérgica a la inmunoadhesina. (En estudios anteriores, no se produjeron episodios adversos de reacciones a la ICAM soluble aplicada por vía tópica en la nariz o a planticuerpos aplicados por vía tópica en la cavidad oral). Los individuos que muestran síntomas de alergia nasal son examinados en busca de anticuerpos IgE de antiinmunoadhesina específica en fluidos de lavado nasal utilizando la técnica ELISA en dos pasos (R&D Systems).

E. Análisis estadístico

El tamaño de la muestra de estos estudios se basa en estudios anteriores que siguen el modelo de exposición al rinovirus. El tamaño de la muestra prevista para los estudios de protección debe ser adecuado para detectar una reducción en la incidencia de resfriados clínicos desde el 75% en el grupo del placebo al 25% en el grupo del tratamiento activo a valores unilaterales de $\alpha=0,05$ y $1-\beta=0,80$. Además, el tamaño de la muestra debe ser suficiente para detectar un cambio en la puntuación total de síntomas de 5 unidades, asumiendo una desviación estándar de 5,8 unidades.

Ejemplo 9: Estudios clínicos que demuestran la capacidad de la inmunoadhesina para reducir la infectividad en los humanos: estudios de exposición (no pertenece a la invención)

Los estudios de exposición se usan para demostrar que el tratamiento con la inmunoadhesina de la presente invención protege contra los resfriados clínicos o reduce los síntomas del resfriado después de una exposición al virus.

A. El virus de desafío

El virus de desafío utilizado en este estudio es el rinovirus 39 (HRV-39). El rinovirus tipo 39 es un grupo importante de rinovirus que necesita la ICAM-1 para adherirse a las células. Se ha comprobado la seguridad de los virus de desafío seleccionados atendiendo a directrices de consenso (Gwaltney et al., Prog. Med. Virol. 39:256-263, 1992). Todos los sujetos fueron inoculados con aproximadamente 200 dosis infectivas al 50% de tejido cultivado (TCID₅₀). El virus se administró en forma de gotas en dos aplicaciones de 250 µl por orificio nasal, espaciadas entre sí unos 15 minutos, mientras los sujetos permanecían en posición supina.

Tabla 5

	Día								
	0	1	2	3	4	5	6	7-14	21
	Horario del estudio de preinoculación								
Medicación		6 dosis	6 dosis	6 dosis	6 dosis	6 dosis			
Inoculación		hora 4							
Puntuación de síntomas		m/n	m/n	m/n	m/n	m/n	m/n	n	
Lavado nasal		m	m	m	m	m	m		
Muestra de suero		X							X
	Horario del estudio de preinoculación								
Medicación		6 dosis	6 dosis	6 dosis	6 dosis	6 dosis			
Inoculación		hora 0							
Puntuación de síntomas		m/n	m/n	m/n	m/n	m/n	m/n	n	
Lavado nasal		m	m	m	m	m	m		
Muestra de suero		X							X
Nota									
En ambos estudios en los días 1-5, se aplican dosis a las horas 0, 3, 6, 9, 12 y 15									
m = mañana									
n = noche									

B. Diseño del estudio

- 5 Se realizan dos estudios aleatorios de exposición al rinovirus (véase Tabla 5). Se evalúa la misma formulación de la inmunoadhesina de la presente invención en estudios previos y posteriores a la inoculación. En ambos estudios, se administran seis dosis diarias de la medicación durante cinco días. A cada sujeto se le asigna recibir aleatoriamente la inmunoadhesina o su placebo correspondiente, en el momento de unirse a cada estudio. Se trata de un estudio
- 10 ciego y todo el personal del ensayo clínico, los sujetos y los empleados de Panorama Reseach continúan ciegos hasta que se han recogido todos los datos.

- En el estudio preinoculación, la administración del medicamento comienza cuatro horas (dos dosis) antes de la exposición al virus. El virus de desafío se administra una hora después de la segunda dosis de inmunoadhesina (o placebo) y las cuatro dosis restantes de la medicación a estudio se administran según horario durante el primer día.
- 15 En este estudio, dieciocho sujetos reciben el tratamiento activo y dieciocho sujetos reciben el placebo.

- En el estudio posinoculación, la administración de los medicamentos comienza 24 horas después de la exposición al virus. Se eligió este momento porque ya se había usado en otros estudios de protección frente a una exposición a virus, y porque los síntomas del resfriado ya son claros (Harris & Gwaltney, Clin. Infect. Dis. 23:1287-90, 1996). El
- 20 virus desafío de este estudio se administra por la mañana del día 0 del estudio, aproximadamente 24 horas antes de recibir la dosis de la medicación objeto de estudio, por la mañana del día 1 del estudio. En este estudio, 36 sujetos reciben el tratamiento activo y 18 sujetos reciben el placebo.

- Se aísla a cada sujeto en habitaciones de hotel desde el día 0 del estudio (el día de la exposición al virus) hasta el día 6. Cada uno de estos días se realiza una puntuación de síntomas y un lavado nasal para aislar los virus, por la
- 25 mañana, antes del la primera dosis de la medicación, y una segunda puntuación de síntomas cada noche. El día 6 del estudio, los sujetos ya no permanecen aislados pero se siguen registrando las puntuaciones de síntomas cada noche hasta el día 14. Los sujetos vuelven al lugar de estudio el día 21 y se les recoge una muestra de suero para detectar los anticuerpos de la antiinmunoadhesina. La cantidad total de la inmunoadhesina que se debe usar en ambos estudios de exposición al virus (sobre un total de 54 sujetos) es de aproximadamente 1200 mg.

30 C. Aislamiento viral

La propagación del virus es detectado por el aislamiento del mismo en cultivo celular. Los ejemplares del lavado nasal se recogen mediante la instilación de 5 ml al 0,9% de solución salina en cada orificio nasal. Este lavado se expulsa dentro de un vaso de plástico y se refrigera durante una o dos horas hasta que se realizan los cultivos virales. La inmunoadhesina se elimina de los ejemplares gracias a un tratamiento con el anticuerpo anti-ICAM-1

- 5 adsorbido a un gel de agarosa (Affi-Gel 10, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.). Una parte de cada ejemplar procesado se guarda a -80 °C y otra parte se inocula en dos tubos de células HeLa, una línea de células HeLa enriquecida para la producción de ICAM-1 (Arruda et al., J. Clin. Microb. 34:1277-1279, 1996). Los rinovirus se identifican por ensayos normales de efecto citopático. A los sujetos cuyo cultivo viral sea positivo en cualquiera de los días del estudio posexposición se les considera infectados. El cálculo de las concentraciones virales en los ejemplares guardados a -80 °C se hace con diluciones en diez veces sobre placas de microconcentración con células HeLa.

- 15 Los anticuerpos contra el virus de desafío son detectados por concentraciones plasmáticas neutralizantes, hechas con los métodos estándar (Gwaltney et al., Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial and Chlamydial Infections, páginas 579-614, American Public Health Association). Los ejemplares de suero para las pruebas de anticuerpo se recogen durante el proceso de selección, inmediatamente antes de la exposición al virus (aguda), y de nuevo 21 días después (convalecencia). Los sujetos con un aumento de al menos cuatro veces la concentración de anticuerpos contra el virus de desafío, al compararse la muestra de suero de la etapa de convalecencia con la muestra de suero de la etapa aguda, se consideran infectados.

D. Evaluación de la gravedad de la enfermedad

- 20 La gravedad de la enfermedad se valora tal y como se describió anteriormente (Turner et al., JAMA 281:1797-804, 1999). Las puntuaciones de síntomas se registran antes de la exposición al virus (punto de referencia) y dos veces al día a intervalos aproximados de doce horas durante los siguientes 6 días. De los días 7 a 14 de estudio, los sujetos registran sus puntuaciones de síntomas una vez al día, por la noche. En cada evaluación, a los sujetos se les pide que analicen la gravedad máxima de los siguientes ocho síntomas, en el intervalo desde la última evaluación de síntomas: estornudos, rinorrea, obstrucción nasal, dolor de garganta, tos, dolor de cabeza, malestar y frío. A cada síntoma se le asigna una puntuación de gravedad de 0 a 3, que se corresponde con una gravedad sintomática de: ausente, leve, moderado o grave. Si los síntomas están presentes en el punto de referencia, la puntuación de los síntomas correspondiente al punto de referencia se eliminará del informe de puntuación sintomática. La puntuación más alta de las dos evaluaciones diarias será tomada como la puntuación diaria para cada síntoma. Las puntuaciones diarias de los síntomas para los ocho síntomas individuales se suman para obtener la puntuación total diaria de los síntomas. Se suma la puntuación total diaria de los síntomas para los 5 primeros días tras la exposición al virus (días 1 a 5 del estudio) y por la noche del día 5 del estudio se les pregunta a todos los sujetos: «¿Consideras que has tenido un resfriado?». De los sujetos que hayan tenido una puntuación total de los síntomas de al menos 6, y que hayan tenido al menos tres días de rinorrea o que su impresión subjetiva haya sido
- 35 que sí hayan tenido un resfriado, se dice que han sufrido un resfriado clínico.

El peso de las secreciones nasales expulsadas se determina durante los días 1 a 7, dándoles a cada sujeto paquetes de pañuelos nasales previamente pesados. Una vez usados los pañuelos, se guardan en bolsas de plástico herméticas. Todas las mañanas se recogen y se pesan los pañuelos usados y los no usados del paquete original.

40 E. Ensayo IL-8

Estudios recientes han sugerido que la respuesta inflamatoria del hospedador, en concreto la interleucina 8 (IL-8), puede estar relacionada con la patogénesis de los síntomas del resfriado común debido a la infección por rinovirus. Las concentraciones de IL-8 en los lavados nasales se determinan con un ELISA comercial (R&D Systems, Minneapolis, Minn.) tal y como se ha descrito anteriormente (Turner et al., JAMA 281:1797-804, 1999).

45 F. Estudios de toxicidad

Los estudios son los mismos tanto para el estudio de exposición como para los estudios de escala a dosis descritos en el ejemplo 8.

G. Análisis estadístico

- 50 El análisis estadístico se realiza de la misma manera que el descrito en el estudio de escalada de dosis del ejemplo 8.

Los ejemplos y discusiones anteriores, aunque predominantemente dirigidos a las inmunoadhesinas ICAM-1, se pueden adaptar fácilmente, por una persona experta, para lograr y aplicar el uso de otros tipos de inmunoadhesinas activas contra otros tipos o subtipos de virus o patógenos bacterianos. Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones de inmunoadhesina antibacteriana, usando el receptor de la toxina del carbunco (ATR) como proteína del receptor.

55 Ejemplo 10: Construcción de los casetes de expresión de la inmunoadhesina del ATR (no pertenece a la invención)

Mediante clonación por RCP se prepara un casete que codifica para una porción del dominio extracelular del receptor de la toxina del carbunco humano (ATR). En concreto, un fragmento de 523 bp, que codifica para los aminoácidos 44-216 (los llamados dominio A del factor de von Willebrand), se amplifica desde un plásmido ATR

5 (Bradley et al., 2001) o desde un plásmido TEM8 (St Croix et al., 2000) usando los siguientes cebadores de oligonucleótido:

5'-GACCTGTACTTCATTTTGGACAAATCAGG-3' (SEC ID N.º: 91)

5'-GAGCTCAAAATTGAGTGGATGATGCCT (SEC ID N.º: 92)

TGCAGAG-3'

10 El segundo cebador (SEC ID N.º: 92) está diseñado para introducir un sitio Sac I en el extremo 3' del dominio de codificación del dominio extracelular del ATR (subrayado sólido). Se realiza una RCP con una polimerasa Pfu (Stratagene) para reducir la acumulación de errores. Se amplifica un segundo fragmento de 124 bp, que contiene un extremo 5' de región no traducida y un péptido señal de planta, a partir de un plásmido 8ATG-TOPO n.º4 (que es un clon por RCP de un extremo 5' de región no traducida optimizada de planta y un péptido señal del vector de clonación Invitrogen pCR4-TOPO), usando los siguientes cebadores de oligonucleótido:

15 5'-GGTACCACTTCTCTCAATCCAACCTTTC-3' (SEC ID N.º: 93)

5'-GTCCAAAATGAAGTACAGGTCAGCCAA (SEC ID N.º: 94)

ACTAGTAGAGGTGAACAAAAGC-3'

20 El primer cebador (SEC ID N.º: 93) está diseñado para introducir un sitio Kpn I en el extremo 5' del fragmento por RCP (subrayado sólido). Los dos fragmentos de RCP tienen 20 nt de secuencia complementaria (punteado). Los dos fragmentos de RCP se mezclan y se amplifica un fragmento de 626 bp usando SEC ID N.º: 93 y SEC ID N.º: 92. El fragmento obtenido por RCP fue clonado dentro del vector PCR-Script (Stratagene) y secuenciado antes de clonarse entre los sitios Kpn I y Sac I del vector pMSP-colCAM, dando como resultado el plásmido pMSP-ATR-IgA2. Esto se traduce en una fusión genética del dominio extracelular de ATR y del dominio constante de la IgA2 humana.

25 Este dominio constante de la IgA2 humana ha sido sintetizado para usar los codones de manera óptima para la expresión de las células de tabaco. La secuencia completa de nucleótidos y aminoácidos de la fusión ATR-IgA2 (la inmunoadhesina) se muestra en la FIG. 10. En el constructo resultante, la expresión de la molécula quimérica ATR-IgA2 está bajo el control del promotor SuperMas (Ni et. al., 1995) y de la secuencia terminadora ags, en el extremo 3'.

30 Se elimina todo el casete de expresión (promotor+ATR-IgA2+terminador) del compuesto pMSP-ATR-IgA2, que tiene la enzima de restricción Asc I, y se clona dentro del vector binario del plásmido Ti *Agrobacterium* pGPTV-kan-ocs, dando como resultado el plásmido pGPTV-kan-ocs-ATR-IgA2. El vector pGPTV-kan-ocs deriva del pGPTV-kan (Becker et al., 1992), que fue modificado de la siguiente manera. La secuencia entre los sitios Eco RI y Hind III de pGPTV-kan, que contiene el gen uid A, se elimina y reemplaza con el extremo 3' del gen terminador ocs (MacDonald et al., 1991) orientado al gen npt II, más los sitios de restricción para Asc I y Sac I. El propósito de este terminador

35 adyacente al borde derecho del ADN-T es eliminar la interferencia transcripcional con el transgén, debido a que la transcripción se origina en el ADN de planta, fuera del borde derecho (Ingelbrecht et al., 1991).

La secuencia entre los bordes del ADN-T del plásmido pGPTV-kan-ocs-ATR-IgA2 se muestra en la FIG. 11. Las secuencias por fuera de los bordes izquierdo y derecho son como se describe (Becker et al., 1992). Los nucleótidos 18-187 representan el borde derecho del ADN-T. Los nucleótidos 311-630 representan el extremo 3' de la región terminadora ocs. Los nucleótidos 927-1976 representan el promotor SuperMas. Los nucleótidos 1990-2017 representan el extremo 5' no traducido del gen psaDb de *Nicotiana glauca* (Yamamoto et al., 1995). El contexto del codón de iniciación AG (nucleótidos 2012-2026) está diseñado para unirse al encontrado en los genes de planta altamente expresados (Sawant et al. 1999). Los nucleótidos 2018-2086 forman una secuencia de codificación para una nueva versión del péptido señal de la legúmina *Vicia faba* (Baumlein et al., 1986). Los nucleótidos 2087-2605 forman una secuencia de codificación para el dominio A del factor de von Willebrand de ATR (Bradley et al., 2001). Los nucleótidos 2606-3631 forman una secuencia de codificación de la región constante de la IgA2m(2) humana (Chintalacheruvu et al., 1994). Los nucleótidos 3794-4108 derivan del terminador agropina sintasa (ags). Los nucleótidos 4530-4800 representan el promotor NOS (Depicker et al., 1982). Los nucleótidos 4835-5626 codifican para el gen NPT II (y confieren resistencia a la kanamicina). Los nucleótidos 5648-5870 son la señal de poliadenilación del gen 7 de *A. tumefaciens* (Gielen et al., 1984). Los nucleótidos 6454-6602 representan el borde izquierdo del ADN-T.

40

45

50

También se ha desarrollado un constructo para la expresión en plantas de la cadena J humana y del componente secretor. Este constructo, pGPTV-hpt-ocs-35SJ/SC, se basa en el vector pGPTV-hpt-ocs, que se ha derivado del mismo modo que se ha descrito anteriormente para el pGPTV-kan-ocs. La secuencia entre los bordes del ADN-T del plásmido pGPTV-hpt-ocs-35SJ/SC se muestra en la FIG. 12. Las secuencias por fuera de los bordes izquierdo y derecho son como se describe (Becker et al., 1992). Los nucleótidos 1-149 representan el borde izquierdo del ADN-T. Los nucleótidos 733-955 son la señal de poliadenilación del gen 7 de *A. tumefaciens* (Gielen et al., 1984). Los nucleótidos 980-2002 (complemento) representan el gen hpt (y confieren resistencia a la higromicina).

55

5 Los nucleótidos 2049-2318 (complemento) representan el promotor NOS (Depicker et al., 1982). Los nucleótidos 2898-3230 representan el promotor 35S del virus mosaico de la coliflor (CaMV), que promueve la expresión del gen del componente secretor humano y su péptido señal nativo (nucleótidos 3236-5056); y los nucleótidos 5060-5445 representan la señal de poliadenilación del gen *rbcS-E9* del guisante (Mogen et al., 1992).

10 Los nucleótidos 5457-5788 representan una segunda copia del promotor 35S del CaMV que promueve la expresión del gen de la cadena J (de unión) humana y de su péptido señal nativo (nucleótidos 5797-6273); y los nucleótidos 6281-6494 representan el terminador del gen 7. Los nucleótidos 6501-6819 (complemento) representan el extremo 3' del gen terminador ocs. Los nucleótidos 6944-7113 representan el borde derecho del ADN-T.

Ejemplo 11: La transformación de plantas y la expresión de la inmunoadhesina de ATR en plantas (no pertenece a la invención)

15 Los casetes de expresión descritos anteriormente se usaron para producir inmunoadhesina en plantas por medio de la transformación mediada por *Agrobacterium*. Los plásmidos pGPTV-hpt-ocs-35SJ/SC y pGPTV-kan-ocs-ATR-IgA2 se introducen por separado dentro de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Los cultivos de ambas cepas se dejan incuban toda la noche y se usan simultáneamente con hojas de tabaco, según el protocolo estándar (Horsch et al., 1985). Se selecciona el tejido de planta transformado en un medio de regeneración que contiene kanamicina (100
20 µg/ml) e higromicina (25 µg/ml).

Las plántulas que se regeneran en presencia de antibiótico se seleccionan para la expresión transgénica. Esto se logra preparando extractos del tejido de la hoja en un tampón de fosfato salino (PBS) y monitorizando los extractos clarificados sobre un papel de nitrocelulosa. Estos «puntos» seleccionados se examinan con un antisuero conjugado de alcalina fosfatasa específico para la IgA humana, la cadena J o el componente secretor. A las plantas que den
25 positivo en el primer cribado se les harán más cribados, incluyendo el Western blot y el RCP. Es de esperar que la inmunoadhesina ATR-IgA2 tenga un PM de la subunidad de 59 kDa. Debido a la dimerización natural de la región constante de cadena pesada, se espera que también se formen dímeros de ~118 kDa. Estos dímeros se vuelven a dimerizar dentro de la célula de planta en presencia de la cadena J, formando una molécula de ~252 kDa. Al añadir el componente secretor, se observa una especie molecular de ~320 kDa.

30 La presencia de un péptido señal en el compuesto de la cadena pesada quimérica, la cadena J y el componente secretor es importante para favorecer la formación de una inmunoadhesina multimérica. Tras la transformación del mRNA, se cree que la escisión del péptido señal depositará cada proteína dentro del retículo endoplasmático (RE) de la célula de planta. Se espera que la formación de la inmunoadhesina multimérica tenga lugar en el RE y los corpúsculos de golgi; la molécula formada será excretada posteriormente desde la célula.

35 Ejemplo 12: Purificación de la inmunoadhesina ATR formada (no pertenece a la invención)

La purificación de la inmunoadhesina ATR formada se puede conseguir siguiendo básicamente el método descrito para la inmunoadhesina ICAM-1 del ejemplo 3 arriba mencionado.

Ejemplo 13: La inmunoadhesina ATR inhibe la acción de la toxina sobre las células de mamífero (no pertenece a la invención)

40 Los casetes de expresión descritos anteriormente se usan para producir la inmunoadhesina formada, purificada a partir de extractos de plantas. La inmunoadhesina purificada se usa para proteger a las células CHO-K1 de la muerte en un bioensayo sencillo. Las células CHO-K1 tienen el receptor al que se une el PA en la superficie celular, pero no son sensibles a la toxina. Mueren cuando se exponen al PA y a la LFN-DTA, una proteína de fusión compuesta por los 255 aminoácidos de N-terminal de LF unidos a la cadena catalítica A de la toxina diftérica. Esta
45 toxina recombinada explota las mismas interacciones de receptor LF-PA que se necesitan para la unión y entrada de las proteínas nativas LF y OF. Para probar el efecto protector de la inmunoadhesina, las células CHO-K1 se mezclan con una cantidad mayor de ATR-IgA2 en presencia de una cantidad constante (tóxica) de PA y LFN-DTA, y se evalúa el efecto posterior sobre la síntesis de proteínas. El ATR-IgA2 es un inhibidor eficaz de la acción de la toxina, que inhibe la acción de la toxina a concentraciones molares más bajas que la ATR soluble.

50 Ejemplo 14: La inmunoadhesina ATR inhibe la acción tóxica de la toxina en sujetos humanos (no pertenece a la invención)

La inmunoadhesina purificada se prepara en un tampón aceptable desde el punto de vista farmacéutico y se administra a sujetos humanos infectados por carbunco. La vía de administración puede ser un inhalador en aerosol o una inyección. Los sujetos que están en las etapas finales de la infección, que normalmente mueren, son protegidos
55 de la acción de la toxina gracias a la inmunoadhesina.

Ejemplo 15: Construcción de un casete de expresión de la inmunoadhesina ATR alternativo (no de la invención)

Se prepara, mediante clonación por RCP, un casete que codifica para todo el fragmento extracelular del ATR humano (los aminoácidos 24-320). En concreto, se amplifica un fragmento de 878 bp a partir del plásmido ATR

- 5 (Bradley et al., 2001) o a partir de un plásmido TEM8 (St Croix et al., 2000) usando los siguientes cebadores de oligonucleótido:

5'-GGGGGACGCAGGGAGGATGGGGGTC (SEC ID N.º: 95)

CAG -3'

5'-GAGCTCCCGTCAGAACAGTGTGTGG (SEC ID N.º: 96)

10 TGGTG-3'

El segundo cebador (SEC ID N.º: 96) está diseñado para introducir un sitio Sac I en el extremo 3' de la región de codificación del dominio extracelular del ATR (subrayado sólido). Se realiza una RCP con una polimerasa Pfu (Stratagene) para reducir la acumulación de errores. Se amplifica un fragmento de 121 bp, que contiene un extremo 5' no traducido y un péptido señal de planta, a partir del plásmido delta, ATG-TOPO n.º 4, usando los siguientes

15 cebadores de oligonucleótido:

5'-GGTACCACTTCTCTCAATCCAACCTTTC-3' (SEC ID N.º: 93)

5'-ATCCTCCCTGCGTCCCCCAGCCAACTAGTA (SEC ID N.º: 97)

GAGGTGAACAAAAGC-3'

20 El primer cebador (SEC ID N.º: 93) está diseñado para introducir un sitio Kpn I en el extremo 5' del fragmento obtenido por RCP (subrayado sólido). Los dos fragmentos obtenidos por RCP tienen 20 nt de secuencia complementaria (punteado). Los dos fragmentos obtenidos por RCP se mezclan y se amplifica un fragmento de 981 bp usando SEC ID N.º: 93 y SEC ID N.º: 96. El fragmento obtenido por RCP es clonado dentro de un casete de expresión de planta para formar una fusión genética con la IgA2 humana de la misma manera que el dominio parcial extracelular del ATR (ejemplo 1).

25 Con una construcción alternativa que siga el mismo método se podrían amplificar los aminoácidos 41-227.

Ejemplo 16: La producción de una proteína quimérica del receptor de la toxina del carbunco: CMG2-IgG y anticuerpos anti-PA de alta afinidad

La construcción de CMG2 unida a la IgG (CMG2-IgG) y los anticuerpos anti-PA de alta afinidad

30 Hace poco tiempo se sintetizaban fragmentos de ADN que codifican a las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del codón optimizado anti-PA y un fragmento que codifica a la porción del dominio extracelular del receptor de la toxina del carbunco humano (CMG2). Tanto el CMG2 como las secuencias de la región variable de la cadena pesada del anti-PA se unieron por separado a los fragmentos de ADN que codifican para los dominios de regiones constantes de la cadena pesada de la IgG1 humana en un vector binario de *Agrobacterium*, bajo el control de un promotor de plantas constituyente (CaMV35S) y una secuencia de la señal de poliadenilación al extremo 3'. Se

35 preparó un vector similar de cadena kappa para la región variable de la cadena ligera 1H. La construcción de estos vectores se describe en detalle más abajo.

Se utilizó la herramienta «Signal IP» para predecir el sitio de escisión del péptido señal de CMG2, que tiene lugar entre los aminoácidos 33 y 34⁴⁵. Usando una tabla de uso de codones derivada de genes de plantas de alta expresión, diseñamos y sintetizamos un fragmento de ADN de 697 bp que incluye un extremo 5' corto no traducido, el péptido señal de la proteína de almacenamiento albúmina 2S2 de *Arabidopsis thaliana*⁴⁶, y los aminoácidos 34-232 de CMG2 (FIG. 14). La parte codificada de CMG2 se corresponde con la usada por Scobie et al. como una proteína soluble³¹. Tras confirmar la secuencia, este fragmento se clonó entre los sitios Kpn I y Sac I del vector pMSP-IgG, que ya tiene la región constante de la IgG1 humana, para formar el plásmido pMSP-CMG2-IgG. Esto se traduce en una fusión genética del dominio extracelular de CMG2 y de la región constante de la IgG1 humana. Esta

45 región constante de la IgG1 humana ha sido sintetizada para usar los codones de manera óptima para la expresión de las células de tabaco. En el constructo resultante, la expresión de la molécula quimérica CMG2-IgG está bajo el control del promotor CaMV35S47 de alta expresión y del extremo 3' del gen terminador *ags*. En la figura 14 se muestra la secuencia esperada de aminoácidos de la proteína madura.

Todo el casete de expresión (promotor+CMG2-IgG+terminador) se subclona, a partir del compuesto pMSP-CMG2-IgG, dentro del vector binario del plásmido Ti *Agrobacterium* pGPTV-kan-ocs, dando como resultado el plásmido pGPTV-kan-ocs-CMG2-IgG. El vector pGPTV-kan-ocs deriva de pGPTV-kan, que a su vez deriva del vector binario más común pBIN19.⁴⁸ El casete de expresión usa un extremo 5' no traducido del gen de *Nicotiana sylvestris* *psaDb*, el cual favorece la traducción.⁴⁹ El contexto del codón de iniciación AG está diseñado para unirse al encontrado en los genes de planta altamente expresados.

55 Para expresar el anticuerpo anti-PA, se sintetiza un fragmento de ADN, que codifica para el dominio variable de la cadena pesada 1H y que tiene codones optimizados de planta, con un sitio Sac I en el extremo 3' de unión a nuestra secuencia de la región constante de la IgG1 humana con codón optimizado. De igual manera, también se sintetiza

5 una secuencia de codificación para el dominio Vk del anticuerpo 1H, con un sitio Hind III en el extremo 3' para unirse a nuestro dominio constante kappa humano con codón optimizado. Estas secuencias incorporan el mismo dominio 5' UTR y el péptido señal que el que se usó con el gen CMG2. Ambas regiones variables se clonaron en vectores de expresión separados bajo el control del promotor CaMV35S, junto con las correspondientes regiones constantes de las cadenas pesada y ligera.

10 La producción proteica en el tabaco usando un sistema de expresión transitoria mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Dos cepas de *Agrobacterium* portadoras de casetes de expresión de las cadenas pesada y ligera 1H se coinfiltraron en las hojas de *Nicotiana benthamiana*, recogida 7 días después y procesada inmediatamente para proceder a la purificación de anticuerpo.⁵¹ De manera similar se infiltró en las hojas una cepa de *Agrobacterium* portadora del casete de expresión CMG2-IgG. Mediante cromatografía de proteína A, se fraccionaron y prepararon los extractos de hojas procedentes de plantas de tabaco transitoriamente transfectadas. Gracias a este enfoque rápido, de alta capacidad y fácilmente reproducible, purificamos pequeñas muestras de 1H y CMG2-IgG.

La tabla 6 muestra los resultados de un experimento típico.

Tabla 6. Aislamiento y purificación de proteínas a partir de hojas de *N. benthamiana* transfectadas transitoriamente.

	gramos	µg/gm		µg/gm producidos	
Proteína	hojas	(ELISA)	µg recuperados	(OD280)	nmoles
1H IgG	100	18	1740	17,4	11,6
CMG2-IgG	74	Sin datos	1140	15,4	9,8

20 Mediante SDS-PAGE se separaron las proteínas purificadas, bajo condiciones reductoras y no reductoras y sujetas a una tinción de plata (FIG. 15). La preparación de 1H IgG contenía una sola banda de 150 kDa, que se redujo a dos bandas de 50 y 26 kDa. Con la técnica del Western blot se confirmó que estas dos bandas eran cadena pesada gamma y cadena ligera kappa (no se muestra). La preparación CMG2-IgG que se eluyó a partir de la proteína A era una mezcla heterogénea de proteínas, con la banda más grande a 45 kDa bajo condiciones no reductoras y a 29 kDa bajo condiciones reductoras. El tamaño esperado, basado en la secuencia de aminoácidos, de un monómero CMG2-IgG es 58 kDa. Bajo condiciones reductoras se ve una banda pequeña a 53 kDa, lo que probablemente represente el monómero intacto CMG2-IgG. Las bandas de migración más rápidas son las de los productos de degradación proteolítica que carecen del dominio VWAI y de todo, o parte, del Cyl. Todas las bandas han reaccionado con antisuero anti-IgGI (datos no mostrados).

30 La preparación de CMG2-IgG migró de nuevo bajo condiciones reductoras en SDS-PAGE y el gel se usó para teñir con Coomassie bandas en membranas PVDF. Tres trozos, que contienen los fragmentos 53, 34 y 29 kDa (FIG. 15) se enviaron a las instalaciones de estructura molecular de UC Davis para someterse a una degradación de Edman (secuenciación de aminoácidos N-terminal). No se pudo recuperar ninguna secuencia de la banda 53 kDa. Esto sugiere la presencia de residuos «bloqueados», lo cual es coherente con el Gln esperado para el amino terminal de CMG2. Los amino terminales de los fragmentos 34 y 29 kDa estaban en los aminoácidos 268 y 297 respectivamente (aminoácidos en negrita con los números 1 y 2 en la figura 14). Estos resultados son coherentes con los modelos del dibujo en la figura 15.

Ejemplo 17: Comprobar la actividad de la toxina anticarbunco in vitro de la proteína quimérica del receptor de la toxina del carbunco

40 Este ejemplo demuestra los métodos de comprobación de la actividad de la toxina anticarbunco de las proteínas quiméricas de receptor de toxina y de las inmunoadhesinas descritas en el presente documento.

Se examinaron el planticuerpo 1H IgG purificado y la antitoxina CMG2-IgGI para analizar su capacidad de neutralizar el PA en un ensayo con macrófagos murinos donde se emplea la toxina letal. Se observó una supervivencia de células murinas macrófagos RAW 264.7 tras la administración de PA más factor letal (100 ng/ml PA, 50 ng/ml LF), así como con distintas concentraciones de 1H IgG o CMG2-IgGI de planta.²⁵ Se preincubaron proteínas antitoxina con toxinas durante unos minutos antes de añadir a los macrófagos. Después de tres horas de exposición a toxinas, se realizó un ensayo indirecto de viabilidad. La concentración de 1H IgG de planta determinó que el anticuerpo tenía un IC₅₀ de ~0,3 µg/ml, muy similar al del mismo anticuerpo de células de animal (no se muestra). La preparación CMG2-IgG también protegía a los macrófagos en el rango de concentración 1-10 µg/ml. Esto sugiere que CMG2-IgG es una antitoxina potente.

Ejemplo 18: La proteína del receptor de la toxina del carbunco. Variantes de la inmunoadhesina CMG2-IgG

Este ejemplo demuestra modificaciones significativas hechas para mejorar la estabilidad y la producción de las proteínas quiméricas de receptor de toxina y de las inmunoadhesinas descritas en el presente documento.

5 La producción y la expresión de las variantes

Mediante RCP, se introdujeron modificaciones en torno al sitio Sac I en la unión entre los dominios de codificación de la CMG2 y la IgG del constructo CMG2-IgG. Se eliminaron catorce aminoácidos que no pertenecían al dominio VWA/I tal y como se define en la estructura cristalina³⁴ (V1 en la figura 14). Dicha secuencia de 14 aminoácidos y su secuencia nucleotídica correspondiente se pueden ver a continuación:

10 TEILELQPPSSVCVG (SEC ID N.º: 102)

act gaa atc cta gaa ttg cag ccc tca agt gtc tgt gtg ggg (SEC ID N.º: 103)

El dominio Cyl de la variante 2a (V2a en la figura 14) fue eliminado, ya que el análisis anteriormente citado sugería que había sitios sensibles a la proteasa en dicho dominio. En la variante 2b tanto los 14 aminoácidos y como el dominio Cy1 se eliminaron. En la variante 3 el dominio Cyl no se elimina, pero los 14 aminoácidos se sustituyeron por un enlace flexible (Gly₃Ser)₃.

15 un enlace flexible (Gly₃Ser)₃.

Todas estas cuatro variantes y el original CMG2-IgG se expresaron transitoriamente en *N. benthamiana* y se purificaron a partir de extractos de hojas por cromatografía de proteína A. Además, el CMG-IgG original se expresó junto con una cadena kappa humana. Las mismas cantidades de cada proteína se sometieron a SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras, y el gel se tiñó con azul Coomassie (FIG. 16). Todas las variantes contienen mucha más cantidad de la forma de mayor peso molecular que el original CMG2-IgG. Las variantes V1 y V3 parecen tener los mismos fragmentos de degradación (30 y 33 kDa) que el original CMG2-IgG, mientras que la variante V2a tiene dos fragmentos diferentes de 30 kDa aproximadamente. La secuenciación amino terminal de estos fragmentos (rodeada por una caja e identificada con los números 4 y 5 en la figura 16) reveló que comienzan justo antes de la región bisagra de V2a (FIG. 15).

20 Todas las variantes contienen mucha más cantidad de la forma de mayor peso molecular que el original CMG2-IgG. Las variantes V1 y V3 parecen tener los mismos fragmentos de degradación (30 y 33 kDa) que el original CMG2-IgG, mientras que la variante V2a tiene dos fragmentos diferentes de 30 kDa aproximadamente. La secuenciación amino terminal de estos fragmentos (rodeada por una caja e identificada con los números 4 y 5 en la figura 16) reveló que comienzan justo antes de la región bisagra de V2a (FIG. 15).

La variante V2b, que contiene solamente el dominio VWA/I de CMG2 y Cy2/Cy3 de IgG, fue más estable que las otras. En condiciones reductoras (banda 11, figura 16) la mayoría de la proteína aparece en una banda 50 kDa, con muy poca degradación aparente (el tamaño esperado de esta proteína, en términos de secuencia de aa, es 46,5 kDa). En condiciones no reductoras (figura 16, banda 5) hay grandes bandas a ~40 kDa y a ~97 kDa. Ambas bandas se reducen hasta el monómero de 50 kDa, lo que indica que se corresponden con formas monoméricas y dímeros con puentes disulfuro (no se muestran datos). La cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) de la proteína V2b muestra un solo pico a 75 kDa (figura 17). La combinación de técnicas SDS-PAGE y SEC sugiere que la proteína es una mezcla de dímeros con puentes disulfuro y dímeros unidos por enlaces no covalentes, probablemente ligados por interacciones entre los dominios Cy3.

30 La combinación de técnicas SDS-PAGE y SEC sugiere que la proteína es una mezcla de dímeros con puentes disulfuro y dímeros unidos por enlaces no covalentes, probablemente ligados por interacciones entre los dominios Cy3.

La expresión de CMG2-IgG en presencia de la cadena ligera kappa

También es interesante saber lo que ocurre con la CMG2-IgG expresada en presencia de la cadena kappa. Se forma una escalera de bandas que comienza con aproximadamente 137 kDa y se incrementa en unidades de 35 kDa (banda 6, figura 16). Cuando se reduce, esta escalera forma tres bandas de 60,40 y 28 kDa (banda 13). La banda de 28 kDa es cadena kappa y la banda de 60 kDa es toda CMG2-IgG. La banda de 40 kDa desde este carril (número 3 en figura 16) se sometió a la degradación de Edman, lo que mostró que su amino terminal estaba en V196. Esto demostró que la cadena kappa podía prevenir la escisión de Cy1, pero no la de la secuencia extra de 14 aminoácidos de CMG2.

40 Esto demostró que la cadena kappa podía prevenir la escisión de Cy1, pero no la de la secuencia extra de 14 aminoácidos de CMG2.

Pruebas de actividad de la antitoxina

El CMG2-IgG original y el CMG2-IgG V2b fueron examinados para observar la actividad de la antitoxina en el ensayo de protección macrófaga, junto con un control negativo de anticuerpo (FIG. 18). El CMG2-V2b IgG fue superior al original, y las demás variantes mostraron niveles intermedios de actividad (datos no mostrados). La concentración de CMG2-IgG V2b que se necesitó para neutralizar la actividad de la toxina del carbunco en un 50% (IC₅₀) fue de 35 ng/ml (promedio de dos ensayos, tabla 2). Esto se compara favorablemente con anticuerpos anti-PA que están siendo desarrollados por Human Genome Sciences (IC₅₀ = 50 ng/ml),⁵² Elusys (IC₅₀ = 80 ng/ml)²⁷ y Avanir (IC₅₀ = 30 a 70 ng/ml).²³ La proporción molar de CMG2-IgG V2b a PA en el IC₅₀ es de 0,38, lo que significa que cada molécula de CMG2-IgG V2b puede neutralizar casi tres moléculas de la toxina letal del carbunco.

50 La proporción molar de CMG2-IgG V2b a PA en el IC₅₀ es de 0,38, lo que significa que cada molécula de CMG2-IgG V2b puede neutralizar casi tres moléculas de la toxina letal del carbunco.

Análisis estructural

Al superponer tres estructuras cristalinas: IgG Fc (1E4K en la Base de Datos de Proteínas⁵³), el dominio VWA/I de CMG2 (con puentes disulfuro internos, 1SHU³⁴) y CMG2 ligado a PA (1T6B³⁶), se deriva un modelo previsto de cómo debe ser la estructura del CMG-IgG V2b y de cómo se debe unir a PA (figura 19). La cromatografía por exclusión de tamaño sugiere que casi toda la CMG2-IgG Var2b tiene forma dimérica, sin embargo, los análisis SDS-PAGE sugieren que al menos el 50% de los dímeros no están unidos por enlaces covalentes. Esto puede ser debido a la forma del dominio VWA/I de CMG2, que es más globular que el dominio Cy1 de la inmunoglobulina, siendo este más alargado (FIG. 19). Un impedimento estérico evitará que las cisteínas de las regiones bisagra de la IgG Fc se acerquen demasiado y formen puentes disulfuro eficaces.

55 Al superponer tres estructuras cristalinas: IgG Fc (1E4K en la Base de Datos de Proteínas⁵³), el dominio VWA/I de CMG2 (con puentes disulfuro internos, 1SHU³⁴) y CMG2 ligado a PA (1T6B³⁶), se deriva un modelo previsto de cómo debe ser la estructura del CMG-IgG V2b y de cómo se debe unir a PA (figura 19). La cromatografía por exclusión de tamaño sugiere que casi toda la CMG2-IgG Var2b tiene forma dimérica, sin embargo, los análisis SDS-PAGE sugieren que al menos el 50% de los dímeros no están unidos por enlaces covalentes. Esto puede ser debido a la forma del dominio VWA/I de CMG2, que es más globular que el dominio Cy1 de la inmunoglobulina, siendo este más alargado (FIG. 19). Un impedimento estérico evitará que las cisteínas de las regiones bisagra de la IgG Fc se acerquen demasiado y formen puentes disulfuro eficaces.

5 La expresión de CMG2-IgG en presencia de CMG2-kappa

Se formó un compuesto formado por los 199 primeros aminoácidos de CMG2 y un dominio constante de cadena kappa humana (CMG2-kappa). CMG2-kappa fue expresada transitoriamente junto con la variante 1 o la variante 3 (ambas contienen dominios Cy1 intactos); las proteínas resultantes se purifican por medio de Proteína-A-Sefarosa. En ambos casos, las especies moleculares dominantes fueron un par de bandas de aproximadamente 180 y 160 kDa (FIG. 20). En condiciones reductoras se observan bandas de 57 kDa, 34 kDa y 13 kDa. Los inmunoblots (no se muestran) demostraron que la banda 57 kDa contenía cadena pesada de IgG, mientras que las bandas más pequeñas reaccionaron al antisuero específico de cadena kappa. El tamaño de la banda más pequeña sería coherente con la incisión de los 14 aminoácidos entre el dominio VWA/I de CMG2 y la región constante kappa. Las principales bandas no reducidas reaccionaron con anti-IgG y antisuero anti-kappa, y probablemente representan las moléculas tetraméricas unidas con dos «cadenas pesadas» y dos «cadenas ligeras». Estas moléculas fueron probadas con ensayos de protección macrófaga RAW. La IC₅₀ fue de 44 ng/ml para V1/k y 32 ng/ml para V3/k (tabla 2). Debido a su mayor tamaño, la proporción molar antitoxina: PA a IC₅₀ fue muy inferior en las nuevas proteínas: 0,25 para V1/k y 0,18 para V3/k.

Tabla 7. IC₅₀ calculada (ng/ml) y relación molar de antitoxina a PA en IC₅₀. Las preparaciones de la CMG2-IgG original y de las variantes se mezclaron con 80 ng/ml de PA y 80 ng/ml de factor letal en ensayos de protección macrófaga RAW (véase protocolo, D. 1.5). Los resultados provienen de ensayos en tres días diferentes.

Variante	Ensayo 20/07/05		Ensayo 27/07/2005		Ensayo 28/07/2005	
	IC ₅₀	Relación Molar	IC ₅₀	Relación Molar	IC ₅₀	Relación Molar
Original						
CMG2-IgG	242	2,16	-	-	224	2,00
V1	-	-	-	-	197	1,80
V2a	-	-	-	-	67	0,72
V2b	41	0,45	-	-	28	0,31
V3	-	-	-	-	100	0,91
V1/K	-	-	44	0,25	-	-
V3/K	-	-	32	0,18	-	-

Eliminación de IgG por medio de FcγR y del efecto N-glicano

Los mecanismos implicados en la neutralización in vivo y en la eliminación de la toxina del carbunco y/o de la infección por *B. anthracis* por varias antitoxinas que están en desarrollo, no son bien conocidos. En el caso de los anticuerpos y las inmunoadhesinas, la neutralización in vivo de los compuestos toxina-antitoxina depende de su interacción con FcγR. Muchos tipos de leucocitos tienen receptores celulares de superficie para los dominios Fc de la IgG, conocidos como FcγR. Unir los compuestos antígeno-anticuerpo a estas células mediante la interacción de Fc-FcγR puede dar como resultado diversas respuestas como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la internalización de los compuestos receptor-ligando.

Las estructuras cristalinas muestran que FcγR se une a la región bisagra más baja de Cy2 del dominio Fc de cadena pesada.⁵⁵ Los estudios genéticos y bioquímicos han identificado residuos de aminoácidos que modulan esta interacción, así como la función del N-glicano de IgG Fc. Los N-glicanos son estructuras de oligosacáridos unidas mediante enlaces covalentes a ciertos residuos asparagina de las glicoproteínas. El análisis de la estructura cristalina sugiere que el N-glicano del Asn²⁹⁷ de IgG humana estabiliza una conformación específica del dominio Fc que promueve la unión FcγR.^{55, 56} (FIG. 21). La eliminación de este N-glicano reduce drásticamente la afinidad de la IgG con las tres principales isoformas de FcγR in vitro, pero no afecta a la semivida in vivo.^{57, 58, 59}

Todavía no se conoce el efecto de la glicosilación o la ausencia de la misma sobre el efecto protector de CMG2-IgG contra la toxina letal del carbunco o contra la infección por *B. anthracis*. Si la eliminación/destrucción eficaz de los complejos antitoxina-PA se ve afectada por la unión al FcγR, puede verse afectado también por el estado de glicosilación de la antitoxina. Los científicos de Avanir Pharmaceuticals compararon la actividad in vivo de formas glicosiladas y no glicosiladas de dos de sus compuestos anticuerpo-anti-PA, y descubrieron muy pocas diferencias en relación a la eficacia protectora.²³ Llegaron a la conclusión de que la neutralización de la toxina letal no está mediada por el efecto Fc. Sin embargo, fue un solo experimento, y observaron una disminución de la eficacia de uno de los anticuerpos no glicosilados. Por este motivo, se analizarán las formas no glicosiladas (la forma analizada en estos ejemplos) y las glicosiladas de la inmunoadhesina CMG2-IgG.

Se observan diferencias sutiles en los N-glicanos de las glicoproteínas de animal y de planta, y algunos han expresado su preocupación sobre la inmunogenicidad/alergenidad de las glicoproteínas de plantas.^{60, 61} La 1H IgG

5 y la CMG2-IgG de estos ejemplos se ha elaborado usando la región constante no glicosilada de la cadena pesada. Se cree que la inmunogenicidad no va a ser un gran problema para una neutralización del tratamiento contra el carbunco basado en una inmunoadhesina hecha de planta, incluso si fuera glicosilada. Si la inmunogenicidad llegase a ser un problema importante, debería ser posible modificar genéticamente las plantas para «humanizar» sus N-glicanos.⁶²⁻⁶⁷

10 Conclusión

Una inmunoadhesina de planta, que consiste en un dominio extracelular del receptor de la toxina del carbunco humano CMG2 unida al dominio Fc de la IgG1 humana (CMG2-IgG), pudo proteger a los macrófagos de ratón de los efectos letales de la toxina letal del carbunco a concentraciones nanomolares. La actividad específica de la inmunoadhesina parece ser comparable a los mejores anticuerpos monoclonales.

15 Ejemplo 19: Otras variantes quiméricas de CMG2-IgG

Este ejemplo demuestra modificaciones significativas que se pueden hacer para mejorar la estabilidad y la producción de las proteínas quiméricas de receptor de toxina y de las inmunoadhesinas descritas en el presente documento.

20 La variante 2b será modificada para aumentar aún más su rendimiento. La introducción de un enlace flexible (Gly₃Ser)₃ entre los dominios VWA/I y Cy2 (véase la estructura en la figura 19) dará como resultado una variante con un alto porcentaje de dímeros unidos por puentes disulfuro que la harán más estable y/o activa in vivo. Los 14 aminoácidos entre el dominio CMG2 VWA/I y el Ck en el compuesto CMG2-kappa también se podrán sustituir por un enlace (Gly₃Ser)₃. Estas dos nuevas proteínas se producirán en tabaco transfectedado transitoriamente y serán purificadas mediante cromatografía de proteína-A-sefariosa. Se comprobará que se hayan unido correctamente y
25 que tenga la estabilidad esperada. Las constantes de enlace serán determinadas por resonancia del plasmón superficial. Su actividad se compara a la de las inmunoadhesinas existentes mediante ensayos de protección macrófaga RAW. No se prevé que la glicosilación afecte a la actividad en este ensayo celular. Sin embargo, la glicosilación puede afectar a la actividad in vivo, de modo que después de seleccionar la inmunoadhesina antitoxina más potente, el sitio de glicosilación en el dominio Cy2 se volverá a introducir. Tanto las versiones glicosiladas como
30 las no glicosiladas serán probadas in vivo.

Complejos moleculares que intervienen en la expresión de CMG2-IgG en el tabaco

La variante 4 será idéntica a la variante 2b pero con un enlace flexible, y será construida mediante la unión de un fragmento de ADN que codifica para el dominio VWA/I más el enlace (Gly₃Ser)₃ a partir de la variante 3 (aminoácidos 1-196, figura 14) a un fragmento de ADN que codifica para la región bisagra y los dominios constantes Cy2-Cy3 a partir de la variante 2b (aminoácidos 298-531, figura 14).
35

Además, CMG2-kappa se modificará, pues se sustituirán los 14 aminoácidos extras por el enlace flexible (Gly₃Ser)₃. Cada variante será emplazada en un casete de expresión bajo el control de un promotor constitutivo de planta (CaMV35S, u otro promotor de nuestra elección) y una secuencia de la señal de poliadenilación del extremo 3' en planta. El casete de expresión será clonado dentro del vector binario pGPTV,⁴⁸ y el plásmido resultante será transformado dentro de la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.
40

Tabla 8

Inmunoadhesina	Disposición del dominio	N.º esperado de sitios de enlace a PA
V2b	CMG2-Cy2-Cy3	2
V4	CMG2-(G ₃ S) ₃ -Cy2-Cy3 VWA/I-GGGSGGGSGGGS-EPKSCDKTHTCP-CH2-CH3	2
V3/CMG-kappa	CMG2-(G ₃ S) ₃ -Cy1-Cy2-Cy3/ CMG2-(G ₃ S) ₃ -Ck	4

Tras seleccionar la antitoxina más potente (usando el ensayo de protección macrófaga), se llevará a cabo una mutagénesis dirigida al sitio para convertir un codón de Gln (en la posición 381 en la figura 14) a Asn, usando un kit comercial.

El sistema de expresión transitoria en el tabaco

45 Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que llevan un vector binario para la expresión de las variantes 2b, 4, 5 o 6, o dos cepas de *Agrobacterium* que llevan la variante 3 más la nueva CMG2-kappa, serán infiltradas en hojas de

- 5 Nicotiana benthamiana (en torno a 100), junto con una cepa adicional que lleva un vector binario (P19) que codifica para un supresor viral de silenciación. El supresor de silenciación se usa para conseguir altos niveles de expresión.

Después de la infiltración, cada *Agrobacterium* transfiere su ADN-T (que contiene los casetes de expresión) desde el vector binario a las células vegetales, donde está integrado y transcrito. La inmunoadhesina se acumula en grandes cantidades en las hojas, que se recogen 7 días después de la infiltración y se procesan para obtener la inmunoadhesina purificada. Pueden producirse pequeñas cantidades de cada una de estas cinco proteínas quiméricas anticuerpo (<5 mg), suficiente para hacer análisis in vitro y de cultivos celulares, al igual que en los estudios de neutralización de toxina in vivo de rata, en un corto espacio de tiempo usando el sistema de expresión de tabaco.⁵¹

La purificación a pequeña escala y la caracterización biofísica de la inmunoadhesina

- 15 Se homogenizan las hojas de tabaco (*N. tabacum* o *N. benthamiana*) y se extraen en una solución tamponada acuosa, se centrifugan y se filtran para eliminar los sólidos; posteriormente, las proteínas con dominios IgG-Fc intactos serán purificadas por cromatografía de proteína-A-sefarosa, dializadas por PBS y esterilizadas por filtración. La proteína purificada se tiñe con una tinción Coomassie y luego se procede a la técnica del inmunoblot usando anticuerpos contra la IgG1 humana (o cadena kappa). Se utilizan cuatro criterios para evaluar el éxito en esta etapa.
- 20 En primer lugar, una proteína quimérica, purificada por proteína A, estará formada por especies de un tamaño. En segundo lugar, deberá tener un peso molecular coherente con la(s) secuencia(s) para la(s) que codifica(n) la(s) proteína(s). En tercer lugar, reaccionará con un antisuero anti-IgG. En cuarto lugar, tendrá una actividad mayor en el ensayo de protección macrófaga RAW que la de la composición actual CMG-IgG V2b. Mediremos la cinética de unión de las inmunoadhesinas al antígeno protector (List Biological Labs) por resonancia del plasmón superficial en un BIAcore (Pharmacia Biosensor), que se usará para calcular el K_d .
- 25

La protección de macrófagos de ratón contra la toxina desafío.

- La supervivencia de células macrófagas de ratón RAW 264.7 (ATCC N.º TIB-71), tras la administración de CMG2-IgG y de la toxina, se determinará básicamente como se describe.⁶⁸ Antes de añadir las células, concentramos la CMG2-IgG desde 10 a 1000 ng/ml y la preincubamos con la toxina (80 ng/ml PA, 80 ng/ml LF) durante 30 minutos.
- 30 Después de tres horas de exposición a la toxina, se realiza un ensayo de viabilidad indirecta utilizando MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio). Incubamos las células en un medio con 2 mg/ml MTT durante 30 minutos, las solubilizamos en isopropanol ácido (40 mM HCl, 0,5% SDS en 90% de alcohol isopropílico) y medimos la absorbancia en A_{595} . El porcentaje de células que sobreviven a la toxina desafío, a una dosis específica de reactivo, comparado con las células de tratamiento simulado, se mide por análisis MTT ((promedio de pocillos de la prueba - promedio de los 8 pocillos solo con toxina) x 100%/promedio de los 8 pocillos sin toxina). Los valores de IC_{50} (concentración de antitoxina con actividad neutralizada al 50%) se estiman a partir de la curva de respuesta a dosis. La relación molar efectiva, o la relación antitoxina-toxina a IC_{50} , también se determina para cada proteína quimérica.
- 35

- 40 El enlace flexible $(Gly_3Ser)_3$ implica una mejora medible en la unión de los dímeros por puentes disulfuro, en la actividad neutralizante in vitro, o en ambos.

Ejemplo 20: La actividad de la antitoxina CMG2-IgG en modelos animales de infección por carbunco

Este ejemplo demuestra las pruebas sobre animales que se pueden realizar para identificar las proteínas quiméricas de receptor de toxina y las inmunoadhesinas de la presente invención.

- La presencia o ausencia del N-glicano del dominio Fc de la inmunoadhesina seleccionada puede afectar a la eficacia in vivo contra la toxina o contra una exposición a una espora de *B. anthracis*, debido a las distintas interacciones con los receptores de Fc y/o semivida en suero de la antitoxina. Tanto las formas aglicosiladas como las glicosiladas de CMG2-IgG se comprueban en un ensayo de neutralización de toxina de rata Fischer. Después se llevan a cabo pruebas de formas in vivo, semivida o ambas, sobre conejos, seguidas de un ensayo de exposición a esporas en conejos. Para los ensayos de neutralización in vivo de toxina de rata se necesitan unos 3 mg de cada antitoxina, procedente de las transfecciones transitorias de tabaco. Para los estudios de farmacocinética y de exposición a esporas en conejos se necesitan unos 200 mg de cada toxina, que serán purificados a partir de tabaco transformado de forma estable.
- 50

La neutralización in vivo de la toxina del carbunco en ratas Fischer

- Los experimentos de neutralización in vivo de la toxina del carbunco se realizan usando formas glicosiladas y aglicosiladas de CMG2-IgG, básicamente como lo describe Ivins.⁶⁹ Anestesiaremos, en una cámara anestésica con isoflurano EZ (Euthanex Corp, PA) siguiendo las directrices del fabricante, a ratas macho de Fischer 344, con catéteres en la vena yugular, y con pesos de entre 200 g y 250 g (Charles River Laboratories). Les administramos una dosis de antitoxina (0,25 y 0,12 nmoles/rata, correspondiente a 1 y 0,5 veces molar, equivalente a la toxina letal), a través del catéter, a 0,2 ml PBS/0,1% BSA pH 7,4. Cinco minutos más tarde, se les administra la toxina letal (PA 20 µg/LF 4 µg de 0,2 ml/200 g rata). El control negativo es una IgG1 humana hecha de planta (nuestro laboratorio). Se usan cinco animales en cada grupo (5 animales/grupo x 2 dosis x 2 antitoxinas = 20 animales), y
- 60

5 cuatro animales en cada uno de los controles (4 animales/grupo x 2 dosis de control de IgG = 8 animales). Se observa a los animales por posibles molestias y para conocer el momento de la muerte y la supervivencia, valorada en función de parada respiratoria y ausencia de latido. Mantenemos a las ratas bajo el efecto de la anestesia hasta 5 horas después de la exposición a la toxina letal, o hasta la muerte, para minimizar el malestar. Las ratas que sobreviven 5 horas se monitorizan durante un periodo de tiempo más largo (hasta 72 horas). Las muestras de suero se recogen de las ratas que sobrevivieron al intervalo de 5 horas y se les analiza la concentración de la antitoxina por medio de ELISA. En un estudio similar, un anticuerpo producido por Avanir Pharmaceuticals protegía a todos los animales contra esta dosis de toxina letal de 0,5 veces molar equivalente a la toxina.²³ Podemos esperar que con nuestra inmunoadhesina hecha de planta suceda lo mismo. Si es necesario, repetiremos los experimentos con inmunoadhesina en relación molar inferior a la toxina letal. La dosis mínima efectiva se determina para cada una de las dos formas de antitoxina.

Los parámetros farmacocinéticos en conejos

Para establecer la farmacocinética (PK) de la CMG2-IgG inyectada por vía intravenosa (i.v.), inyectamos CMG2-IgG a una dosis de 10 mg/conejo i.v. a la arteria auricular de conejos holandeses enanos (tres por grupo; de 1,5 a 2,0 kg). Se recogen muestras de sangre de la arteria auricular de cada animal una hora antes de la inyección, a las horas 1, 4 y 8, y los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 17, 19 y 21 después de la inyección. Obtenemos el suero tras la coagulación y centrifugación, y lo guardamos a -80 °C hasta realizar el análisis.

La concentración de CMG2-IgG en las muestras de suero de los conejos se mide con la técnica funcional ELISA. La CMG2-IgG purificada se usa como un patrón. Con el antígeno protector (List Biological Labs), a una concentración de 1 µg/ml, se recubren los pocillos (100 µl/pocillo) de las placas de microtitulación (Costar Corp.), que se dejan incubar toda la noche a 4 °C. El antígeno sin ligar es eliminado y los pocillos se bloquean con PBS + 5% de leche en polvo desnatada, durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se aspira la solución de bloqueo. Las muestras y el patrón se aplican sobre la placa recubierta de PA, durante 1 h a 37 °C, para luego lavarlo tres veces. Para continuar este proceso, añadimos peroxidasa del rábano (HRP) de IgG antihumana de cabra, conjugada durante 1 h a 37 °C, y luego lo lavamos tres veces. Los compuestos de anticuerpo se detectan añadiendo un sustrato de HRP e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. El desarrollo del color (absorbancia a 405 nm) se determina usando un lector de microplacas Benchmark. Realizamos la prueba de ELISA para conocer la interferencia del suero de conejo y la unión no específica.

Los parámetros descriptivos de PK se determinan por métodos estándar independientes de modelo,⁷⁰ basados en los datos de concentración en suero por tiempo para la CMG2-IgG. La referencia de tiempo predosis para la administración i.v. se asigna al valor de concentración de la primera referencia de tiempo que se toma para los cálculos de PK. Se analiza el caso de cada conejo para obtener la concentración sérica máxima ($C_{m\acute{a}x}$), el tiempo necesario para llegar a la $C_{m\acute{a}x}$, la zona por debajo de la curva, la eliminación sistémica, la semivida terminal y la biodisponibilidad absoluta (F).

La exposición de los conejos a aerosoles con esporas de *Bacillus anthracis*

40 Los modelos de animales se han desarrollado para estudiar la protección pasiva de la infección por carbunco en conejillos de indias^{29, 71, 72}, ratones^{9, 73, 75} y conejos⁷⁶. Una ventaja de los modelos de ratón es que se necesita mucha menos antitoxina. Sin embargo, la mejor protección con anticuerpos anti-PA se ha observado en conejos^{24, 27} así que planeamos utilizar este mismo modelo para probar nuestra CMG2-IgG.

A partir del mes 16, las proteínas quiméricas de receptor de toxina, tanto glicosiladas como aglicosiladas, se probarán en un estudio profiláctico de preexposición. Si los conejos están protegidos (100% a la máxima dosis de antitoxina) en este estudio, entonces haremos un estudio de tratamiento posexposición que empezará en torno al mes 21. Los conejos holandeses enanos (1,5 a 2 kg) se distribuirán aleatoriamente en grupos que contengan cuatro machos y cuatro hembras. Durante la etapa de profilaxis preexposición, los conejos recibirán, el día 0, una única dosis de CMG2-IgG i.v. (1, 2 o 4 mg de CMG2-IgG/conejo por la arteria auricular) o una solución tamponada de fosfato salino (PBS) i.v. como control, de 30 a 45 minutos antes de la exposición a las esporas del carbunco. Para evaluar la eficacia posexposición, expondremos a los conejos a las esporas en el día 0, y luego se les dará una única inyección i.v. de 4 mg de CMG2-IgG/conejo a las horas 24, 36 y 48, después de la exposición, o de PBS i.v. 48 h después de la exposición. Siguiendo el protocolo estándar, solo se expondrá a los conejos por el hocico. La dosis de aerosol objetivo de exposición para el desafío es 200 veces el 50% de la dosis letal (LD_{50}) de la cepa Ames ($Ames\ LD_{50} = 1,05 \times 10^5$ esporas⁷⁶). Las dosis reales de exposición se determinarán a partir de la concentración inicial y de un volumen acumulado por minuto que se recoge a lo largo de toda la exposición. Se observará a todos los animales dos veces al día durante 28 días posexposición. Se recogerán muestras de sangre y suero preexposición y en los días 1, 2, 7, 10, 14, 21 y 28 posexposición. Siempre que sea posible, las muestras de sangre y suero se obtendrán de los animales moribundos que se hayan muerto recientemente («en el momento de la muerte») y se analizarán para buscar *B. anthracis*. El día 28, los animales supervivientes serán sacrificados, pero se recogerán y cultivarán sus pulmones, bazo y ganglios linfáticos intratorácicos. Las muestras de suero serán esterilizadas por filtración y consideradas no infecciosas por cultivo antes de enviarlas a Planet Biotechnology, donde se realizarán análisis ELISA para determinar los valores séricos de CMG2-IgG (como en D.2.3) y las concentraciones de anti-PA de conejo (descritas más abajo).

5 La medición de la respuesta del anticuerpo anti-PA de conejo a las inmunoadhesinas

Estudios anteriores han encontrado que los conejos protegidos de la inhalación de carbunco por anticuerpos monoclonales anti-PA desarrollaron unas concentraciones protectoras de sus propios anticuerpos anti-PA. La técnica de ELISA, similar a la utilizada para establecer los valores de CMG2-IgG en el suero, se utilizará para medir la respuesta inmune contra PA en los conejos expuestos a las esporas del carbunco. En este ensayo se recubren las placas de microtitulación con PA a una concentración de 1 µg/ml y se dejan incubar durante toda la noche a 4 °C. El antígeno no ligado se elimina por lavado y se bloquean los pocillos. Luego, se aspira la solución de bloqueo. Las diluciones de las muestras de suero se incuban en la placa durante 1 hora a 37 °C. Añadimos, durante 30 minutos a 37 °C, un conjugado de peroxidasa del rábano de IgG anticonejo de cabra (Santa Cruz Biotech), y para desarrollar el color añadimos sustrato HRP y dejamos incubar 30 minutos a temperatura ambiente. El desarrollo del color (absorbancia a 405 nm) se determinará por lector de microplacas Benchmark. La dilución del suero resultante a una señal de densidad óptica de 1,0 se usará como medida a la respuesta (concentración).

Ejemplo 21. Proteínas quiméricas del receptor de la toxina botulínica (no pertenece a la invención)

Las proteínas quiméricas del receptor de la toxina botulínica se construyen mediante la fusión de un receptor de la toxina botulínica a una región constante de cadena pesada. De modo que se construyen la sinaptotagmina I (STI) de las proteínas quiméricas del receptor de la toxina botulínica y la SV2 de las proteínas quiméricas del receptor de la toxina botulínica.

La fusión del receptor de la toxina botulínica a la cadena pesada

Las porciones de STI (fragmento STI) y de SV2 (fragmento SV2), esas secuencias de aminoácidos suficientes para unirse a la toxina, se fusionan con la región constante de cadena pesada con secuencia(s) proteínica(s) adicional(es), necesaria(s) para la acumulación, la solubilidad, la purificación, la resistencia a la proteasa y las siguientes modificaciones para alterar la inmunogenicidad o para aumentar la semivida en el paciente y la selección, como la posibilidad de interactuar favorablemente con gangliósidos como Gt1b y Gd1a. Los enlaces polipéptidos, como ((Gly)xSer)n, también se incluyen para aislar las necesidades de plegado y la funcionalidad de estas secuencias. Las secuencias de aminoácidos que codifican para estos polipéptidos, se optimizan de modo que incluyan el uso de codones sinónimos, para evitar la recombinación durante la clonación y la transformación, y para evitar la expresión de la pequeña inhibición mediada por ARN.

Los fragmentos del receptor de proteína botulínica fusionados a la región constante de cadena pesada también pueden ser homomultímeros y heteromultímeros de los fragmentos STI o SV2. En el caso de los homomultímeros, el fragmento de receptor de la toxina botulínica fusionado a la región constante de cadena pesada es una cadena simple de polipéptidos donde está presente, una o más veces, la secuencia del fragmento STI o del SV2, por ejemplo, la secuencia del fragmento está presente en serie en una secuencia simple de aminoácidos primarios. Se espera que los fragmentos de enlace multimerizados aumenten la afinidad aparente del enlace, por un efecto de avididad, y por lo tanto que se incremente la potencia. En el caso de los heteromultímeros, el fragmento del receptor de la toxina botulínica fusionado a la región constante de cadena pesada es una cadena simple de polipéptidos donde está presente, una o más veces, la secuencia del fragmento STI o del SV2, por ejemplo, la secuencia del fragmento está presente en serie en una secuencia simple de aminoácidos primarios. La posición de las secuencias del fragmento repetidas en la matriz lineal es variada para aumentar la avididad del enlace y así aumentar la potencia.

La proteína quimérica del receptor de la toxina botulínica

Cada uno de los fragmentos de receptor de la toxina botulínica descritos anteriormente se fusiona a la región Fc de IgG o IgA, en particular, al amino o carboxilo terminal de las regiones constantes de cadena pesada 1, 2 y 3 ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$) o a las regiones constantes de cadena pesada 2 y 3 ($\alpha 2$ y $\alpha 3$ o $\gamma 2$ y $\gamma 3$). También se podrán construir regiones quiméricas constantes de cadena pesada. Por ejemplo, se puede usar una región quimérica constante de cadena pesada $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ para favorecer la purificación por medio de cromatografía de afinidad de Proteína G.

50 La proteína quimérica del receptor de la toxina botulínica mejorada con región constante de cadena pesada

Cada uno de los fragmentos del receptor de la toxina botulínica anteriormente descritos se fusiona con la región Fc de IgG o de IgA, igual que antes, en cadenas polipeptídicas separadas, y también a la región constante de la cadena ligera (κ o λ), tanto en el amino terminal como en el carboxilo terminal. Las regiones constantes de anticuerpo se unen durante la síntesis y la maduración celular formando moléculas tetraméricas, donde las regiones constantes de las cadenas ligera y pesada se unen, de un modo canónico, por interacciones proteína-proteína con enlaces covalentes y no covalentes entre los diversos dominios constantes.

La proteína quimérica del receptor de la toxina botulínica mejorada con dominio constante de cadena pesada y un dominio variable de anticuerpo

Al complejo formado por un fragmento del receptor de la toxina botulínica y por una región constante de cadena ligera se le añade una región variable de anticuerpo con una especificidad de unión que mejora el rendimiento del

- 5 señuelo. Para mejorar el rendimiento del señuelo se pueden usar los siguientes tipos de especificidad de la región variable: una especificidad de enlace antigangliósido, para orientar al señuelo hacia las membranas sinápticas, donde se sabe que se concentra la toxina botulínica; una especificidad de enlace que dirige al señuelo a apartarse de las membranas sinápticas hacia otros componentes séricos o celulares, como los que participan en la eliminación mediada por el dominio Fc, para garantizar una destrucción rápida de la toxina botulínica; una especificidad antitoxina para favorecer la unión de la toxina o favorecer un reconocimiento más amplio de la toxina, haciendo que las regiones variables reconozcan otras secuencias de aminoácidos de toxina, que se pueden utilizar para facilitar los cruces de toxinas y para mejorar los enlaces.

Los multímeros de orden superior

- 15 Las fusiones de los multímeros de orden superior con IgA se forman mediante la unión de los polipéptidos descritos anteriormente con los dominios constantes de cadena pesada $\alpha 2$ y $\alpha 3$, lo que conlleva la posterior fusión de la cadena de unión (cadena J) y el componente secretor (SC) o la proteína de protección (PP).

Los multímeros de orden superior también están formados por la fusión de los polipéptidos descritos anteriormente con las regiones constantes de cadena pesada de la IgM, los cuales favorecen la unión de la cadena J y la unión de varios (cinco) anticuerpos con el receptor señuelo del tipo IgM.

20 Referencias adicionales

1. Dixon, T. C, Fadl, A. A., Koehler, T. M., Swanson, J. A. & Hanna, P. C. *Early Bacillus anthracis-macrophage interactions: intracellular survival and escape*. Cell Microbiol 2,453-63 (2000).
2. Leppla, S. H. *Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells*. Proc Natl Acad Sci USA 79, 3162-6 (1982).
- 25 3. Vitale, G., Pellizzari, R., Recchi, C., Napolitani, G., Mock, M. & Montecucco, C. *Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages*. Biochem Biophys Res Commun 248, 706-11. (1998).
4. Duesbery, N. S. et al. *Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor*. Science 280, 734-7 (1998).
- 30 5. Friedlander, A. M. *Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid- dependent process*. J Biol Chem 261, 7123-6 (1986).
6. Hanna, P. C, Acosta, D. & Collier, R. J. *On the role of macrophages in anthrax*. Proc Natl Acad Sci USA 90, 10198-201 (1993).
7. Popov, S. G. et al. *Systemic cytokine response in murine anthrax*. Cell Microbiol 6, 225-33 (2004).
- 35 8. Alibek, K. & Handelman, S. *Biohazard — the chilling true story of the largest covert biological weapons program in the world — told from inside by the man who ran it* (Random House, 1999).
9. Karginov, V. A. et al. *Treatment of anthrax infection with combination of ciprofloxacin and antibodies to protective antigen of Bacillus anthracis*. FEMS Immunol Med Microbiol 40, 71-4 (2004).
- 40 10. Joellenbeck, L. M., Zwanziger, L. L., Durch, J. S. & Strom, B. L. (eds.) *The Anthrax Vaccine: Is It Safe? Does It Work?* (Natl. Acad. Press, Washington, DC, 2002).
11. Ivins, B. E., Welkos, S. L., Little, S. F., Crumrine, M. H. & Nelson, G. O. *Immunization against anthrax with Bacillus anthracis protective antigen combined with adjuvants*. Infect Immun 60, 662-8 (1992).
12. Hambleton, P. & Turnbull, P. C. *Anthrax vaccine development: a continuing story*. Adv Biotechnol Processes 13, 105-22 (1990).
- 45 13. Tan, Y., Hackett, N. R., Boyer, J. L. & Crystal, R. G. *Protective immunity evoked against anthrax lethal toxin after a single intramuscular administration of an adenovirus-based vaccine encoding humanized protective antigen*. HumGene Ther 14, 1673-82 (2003).
14. Galloway, D. R. & Baillie, L. *DNA vaccines against anthrax*. Expert Opin Biol Ther 4, 1661-7 (2004).
- 50 15. Rhie, G. E., Roehrl, M. H., Mourez, M., Collier, R. J., Mekalanos, J. J. & Wang, J. Y. *A dually active anthrax vaccine that confers protection against both bacilli and toxins*. Proc Natl Acad Sci USA 100, 10925-30 (2003).
16. Hermanson, G. et al. *A cationic lipid-formulated plasmid DNA vaccine offers sustained antibody-mediated protection against aerosolized anthrax spores*. Proc Natl Acad Sci USA 101, 13601-6 (2004).
17. Watson, J., Koya, V., Leppla, S. H. & Daniell, H. *Expression of Bacillus anthracis protective antigen in*

- 5 *transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop*. Vaccine 22, 4374-4384 (2004).
18. Rainey, G. J. & Young, J. A. *Antitoxins: novel strategies to target agents of bioterrorism*. Nat Rev Microbiol 2, 721-6 (2004).
19. Artenstein, A. W. et al. *Chloroquine Enhances Survival in Bacillus anthracis Intoxication*. The Journal of Infectious Diseases 190, 1655-1660 (2004).
- 10 20. Shoop, W. L. et al. *Anthrax lethal factor inhibition*. Proc Natl Acad Sci USA 102, 7958-63 (2005).
21. Forino, M. et al. *Efficient synthetic inhibitors of anthrax lethal factor*. Proc Natl Acad Sci USA 102, 9499-9504 (2005).
22. Wang, F. et al; *Human monoclonal antibodies that neutralize anthrax toxin by inhibiting heptamer assembly*. Hum Antibodies 13, 105-10 (2004).
- 15 23. Sawada-Hirai, R. et al. *Human anti- anthrax protective antigen neutralizing monoclonal antibodies derived from donors vaccinated with anthrax vaccine adsorbed*. J Immune Based Ther Vaccines 2, 5 (2004).
24. Peterson, J. W. et al. in *American Society for Microbiology Human Monoclonal anti-PA antibody completely protects rabbits and is synergistic with ciprofloxacin in protecting mice and guinea pigs against inhalational anthrax* (2005).
- 20 25. Maynard, J. A. et al. *Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity*. Nat Biotechnol 20, 597-601 (2002).
26. Harvey, B. R., Georgiou, G., Hayhurst, A., Jeong, K. J., Iverson, B. L. & Rogers, G. K. *Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from Escherichia coli-expressed libraries*. Proc Natl Acad Sci USA 101, 9193-8 (2004).
- 25 27. Mohamed, N. et al. *A high-affinity monoclonal antibody to anthrax protective antigen passively protects rabbits before and after aerosolized Bacillus anthracis spore challenge*. Infect Immun 73, 795-802 (2005).
28. Beebe, L. et al. in *Program and abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47 Protection against inhalation anthrax-induced lethality by a human monoclonal antibody to protective antigen in rabbits and cynomolgus monkeys* [abstract 3836]. (American Society for Microbiology, (Chicago). Washington, DC, 2003).
- 30 29. Altboum, Z., Gozes, Y., Barnea, A., Pass, A., White, M. & Kober, D. *Postexposure prophylaxis against anthrax: evaluation of various treatment regimens in intranasally infected guinea pigs*. Infect Immun 70, 6231-41 (2002).
- 30 30. Bradley, K. A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R. J. & Young, J. A. *Identification of the cellular receptor for anthrax toxin*. Nature 414, 225-9 (2001).
- 35 31. Scobie, H. M., Rainey, G. J., Bradley, K. A. & Young, J. A. *Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor*. Proc Natl Acad Sci USA 100, 5170-4 (2003).
32. Liu, S. & Leppla, S. H. *Cell surface tumor endothelium marker 8 cytoplasmic tail-independent anthrax toxin binding, proteolytic processing, oligomer formation, and internalization*. J Biol Chem 278, 5227-34 (2003).
- 40 33. Rosovitz, M. J. et al. *Alanine-scanning mutations in domain 4 of anthrax toxin protective antigen reveal residues important for binding to the cellular receptor and to a neutralizing monoclonal antibody*. J Biol Chem 278, 30936-44 (2003).
34. Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Scobie, H. M., Young, J. A. & Collier, R. J. *Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of human capillary morphogenesis protein 2: an anthrax toxin receptor*. Proc Natl Acad Sci USA 101, 6367-72 (2004).
- 45 35. Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Melnyk, R. A., Harrison, S. C. & Collier, R. J. *Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: A role for receptor in pH-dependent pore formation*. Proc Natl Acad Sci USA (2004).
36. Santelli, E., Bankston, L. A., Leppla, S. H. & Liddington, R. C. *Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor*. Nature 430, 905-8 (2004).
- 50 37. Wigelsworth, D. J., Krantz, B. A., Christensen, K. A., Lacy, D. B., Juris, S. J. & Collier, R. J. *Binding stoichiometry and kinetics of the interaction of a human anthrax toxin receptor, CMG2, with protective antigen*. J Biol Chem 279, 23349-56 (2004).

- 5 38. Scobie, H. M. & Young, J. A. *Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen*. Curr Opin Microbiol 8, 106-12 (2005).
39. Martin, S., Casasnovas, J. M., Staunton, D. E. & Springer, T. A. *Efficient neutralization and disruption of rhinovirus by chimeric ICAM-1/immunoglobulin molecules*. J Virol 67, 3561-8 (1993).
- 10 40. Ober, R. J., Martinez, C., Vaccaro, C., Zhou, J. & Ward, E. S. *Visualizing the Site and Dynamics of IgG Salvage by the MHC Class I-Related Receptor, FcRn*. J Immunol 172, 2021-2029 (2004).
41. Ma, J. et al. *Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans*. Nature Medicine 4, 601-606 (1998).
42. Ma, J. K. et al. *Generation and assembly of secretory antibodies in plants*. Science 268, 716-719 (1995).
- 15 43. Larrick, J. W., Yu, L., Chen, J., Jaiswal, S. & Wycoff, K. *Production of antibodies in transgenic plants*. Res Immunol 149, 603-8 (1998).
44. *Organisms, C. o. t. B. C. o. G. E. 6 Biological Confinement of Genetically Engineered Organisms*. (National Research Council, Washington, D.C., 2004).
45. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. *Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites*. Protein Engineering 10, 1-6 (1997).
- 20 46. Guerche, P., Tire, C., De Sa, F. G., De Clercq, A., Van Montagu, M. & Krebbers, E. *Differential Expression of the Arabidopsis 2S Albumin Genes and the Effect of Increasing Gene Family Size*. Plant Cell 2, 469-478 (1990).
47. Odell, J. T., Nagy, F. & Chua, N. H. *Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter*. Nature 313, 810-812 (1985).
- 25 48. Becker, D., Kemper, E., Schell, J. & Masterson, R. *New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border*. Plant Molecular Biology 20, 1195-1197 (1992).
49. Yamamoto, Y. Y., Tsuji, H. & Obokata, J. *5'-leader of a photosystem I gene in Nicotiana glauca, psaDb, contains a translational enhancer*. J Biol Chem 270, 12466-70 (1995).
- 30 50. Sawant, S. V., Singh, P. K., Gupta, S. K., Madnala, R. & Tuli, R. *Conserved nucleotide sequences in highly expressed genes in plants*. Journal of Genetics 78, 123-131 (1999).
51. Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D. *An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus*. Plant J 33, 949-56 (2003).
- 35 52. Zhang, X. et al. in *Program and abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 277 *Selection of potent neutralizing human monoclonal antibodies to protective antigen of Bacillus anthracis* [abstract 3976]. (American Society for Microbiology, (Chicago). Washington, DC, 2003).
53. Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V. & Jacob, U. *The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex*. Nature 406, 267-73 (2000).
- 40 54. Wein, L. M. & Liu, Y. *Analyzing a bioterror attack on the food supply: The case of botulinum toxin in milk*. Proc Natl Acad Sci USA 102, 9984-9 (2005).
55. Shields, R. L. et al. *High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R*. J Biol Chem 276, 6591-604 (2001).
- 45 56. Radaev, S. & Sun, P. D. *Recognition of IgG by Fc gamma receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors*. J Biol Chem 276, 16478-83 (2001).
57. Jefferis, R. & Lund, J. *Interaction sites on human IgG-Fc for Fc gammaR: current models*. Immunol Lett 82, 57-65 (2002).
58. Dorai, H., Mueller, B. M., Reisfeld, R. A. & Gillies, S. D. *Aglycosylated chimeric mouse/human IgG1 antibody retains some effector function*. Hybridoma 10, 211-7 (1991).
- 50 59. Hand, P. H. et al. *Comparative biological properties of a recombinant chimeric anti- carcinoma mAb and a recombinant aglycosylated variant*. Cancer Immunol Immunother 35, 165-74 (1992).
60. Cabanes-Macheteau, M. et al. *N-Glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants*.

- 5 Glycobiology 9, 365-72 (1999).
61. Ko, K. et al. *Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody*. Proc Natl Acad Sci USA 100, 8013-8 (2003).
62. Lerouge, P., Bardor, M., Pagny, S., Gomord, V. & Faye, L. *N-glycosylation of recombinant pharmaceutical glycoproteins produced in transgenic plants: towards a humanisation of plant N-glycans*. Curr Pharm Biotechnol 1, 347-54 (2000).
- 10 63. Palacpac, N. Q. et al. *Stable expression of human β galactosyltransferase in plant cells modifies N-linked glycosylation patterns*. Proc Natl Acad Sci USA 96, 4692-7 (1999).
64. Bakker, H. et al. *Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants*. Proc Natl Acad Sci USA 98, 2899-904 (2001).
- 15 65. Misaki, R., Kimura, Y., Palacpac, N. Q., Yoshida, S., Fujiyama, K. & Seki, T. *Plant cultured cells expressing human β galactosyltransferase secrete glycoproteins with galactose-extended N-linked glycans*. Glycobiology 13, 199-205 (2003).
66. Pagny, S. et al. *Structural requirements for Arabidopsis β galactosyltransferase activity and targeting to the Golgi*. Plant J 33, 189-203 (2003).
- 20 67. Koprivova, A. et al. *Targeted knockouts of Physcomitrella lacking plant-specific immunogenic N-glycans*. Plant Biotechnology Journal 2, 517-523 (2004).
68. Varughese, M., Chi, A., Teixeira, A. V., Nicholls, P. J., Keith, J. M. & Leppla, S. H. *Internalization of a Bacillus anthracis protective antigen-c-Myc fusion protein mediated by cell surface anti-c-Myc antibodies*. Mol Med 4, 87-95 (1998).
- 25 69. Ivins, B. E., Ristoph, J. D. & Nelson, G. O. *Influence of body weight on response of Fischer 344 rats to anthrax lethal toxin*. Appl Environ Microbiol 55, 2098-100 (1989).
70. Perrier, D. & Gibaldi, M. *General derivation of the equation for time to reach a certain fraction of steady state*. J Pharm Sci 71, 474-5 (1982).
- 30 71. Little, S. F., Ivins, B. E., Fellows, P. F. & Friedlander, A. M. *Passive protection by polyclonal antibodies against Bacillus anthracis infection in guinea pigs*. Infect Immun 65, 5171-5 (1997).
72. Kobiler, D., Gozes, Y., Rosenberg, H., Marcus, D., Reuveny, S. & Altboum, Z. *Efficiency of protection of guinea pigs against infection with Bacillus anthracis spores by passive immunization*. Infect Immun 70, 544-60 (2002).
- 35 73. Lyons, C. R. et al. *Murine model of pulmonary anthrax: kinetics of dissemination, histopathology, and mouse strain susceptibility*. Infect Immun 72, 4801-9 (2004).
74. Steward, J., Lever, M. S., Simpson, A. J., Sefton, A. M. & Brooks, T. J. *Post-exposure prophylaxis of systemic anthrax in mice and treatment with fluoroquinolones*. J Antimicrob Chemother 54, 95-9 (2004).
75. Brossier, F., Levy, M., Landier, A., Lafaye, P. & Mock, M. *Functional analysis of Bacillus anthracis protective antigen by using neutralizing monoclonal antibodies*. Infect Immun 72, 6313-7 (2004).
- 40 76. Zaucha, G. M., Pitt, L. M., Estep, J., Ivins, B. E. & Friedlander, A. M. *The pathology of experimental anthrax in rabbits exposed by inhalation and subcutaneous inoculation*. Arch Pathol Lab Med 122, 982-92 (1998).
77. Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. & Fraley, R. T. *A simple and general method for transferring genes into plants*. Science 227, 1229-1231 (1985).
- 45 78. Rogers, S. G., Horsch, R. B. & Fraley, R. T. *Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti plasmid vectors*. Methods Enzymol. 118, 627-640 (1986).
79. Cundell, A. *Microbial Testing in Support of Aseptic Processing*. Pharmaceutical Technology 28, 56-66 (2004).
80. Hariharan, M., VanNoord, T. & Greden, J. F. *A high-performance liquid-chromatographic method for routine simultaneous determination of nicotine and cotinine in plasma*. Clin Chem 34, 724-9 (1988).
- 50 81. Little, S. F. et al. *Characterization of lethal factor binding and cell receptor binding domains of protective antigen of Bacillus anthracis using monoclonal antibodies*. Microbiology 142 (Pt 3), 707-15 (1996).
82. Bäumlein, H., Wobus, U., Pustell, J., Kafatos, F.C. (1986) *The legumin gene family: structure of a B type*

- 5 *gene of Vicia faba and a possible legumin gene specific regulatory element*. Nucl. Acids Res. 14: 2707-2713
83. Becker, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R. (1992) *New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border*. Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197
84. Bradley, K.A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R.J., Young, J.A.T. (2001) *Identification of the cellular receptor for anthrax toxin*. Nature 414: pre-publication
- 10 85. Chintalacharuvu, K.R., Raines, M., Morrison, S.L. (1994) *Divergence of human alpha-chain constant region gene sequences. A novel recombinant alpha 2 gene*. Journal of Immunology 152: 5299-5304
86. Crump et al. (1994) *Comparative Antirhinoviral Activities of Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 (sICAM-1) and Chimeric ICAM-1 Immunoglobulin A Molecule*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38:6, p. 1425-1427
- 15 87. Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H.M. (1982) *Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence*. J. Mol. Appl. Genet. 1: 561-573
88. Gielen, J., De Beuckeleer, M., Seurinck, J., Deboeck, F., De Greve, H., Lemmers, M., Van Montagu, M., Schell, J. (1984) *The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTi Ach5*. Embo J 3: 83546
- 20 89. Greve et al. (1991) EP 0468257, *Multimeric form of human rhinovirus receptor protein*.
90. Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985) *A simple and general method for transferring genes into plants*. Science 227: 1229-1231
91. Ingelbrecht, I., Breyne, P., Vancompernelle, K., Jacobs, A., Van Montagu, M., Depicker, A. (1991) *Transcriptional interference in transgenic plants*. Gene 109: 239-242
- 25 92. MacDonald, M.H., Mogen, B.D., Hunt, A.G. (1991) *Characterization of the polyadenylation signal from the T-DNA-encoded octopine synthase gene*. Nucleic Acids Res 19: 5575-81
93. Martin et al. (1993), *Efficient Neutralization and Disruption of Rhinovirus by Chimeric ICAM-1/Immunoglobulin Molecules*. J. of Virology, 67:6, p. 3561-3568.
- 30 94. Mogen, B.D., MacDonald, M.H., Leggewie, G., Hunt, A.G. (1992) *Several distinct types of sequence elements are required for efficient mRNA 3' end formation in a pea rbcS gene*. Mol Cell Biol 12: 5406-14
95. Ni, M., Cui, D., Einstein, J., Narasimhulu, S., Vergara, C.E., Gelvin, S.B. (1995) *Strength and tissue specificity of chimeric promoters derived from the octopine and mannopine synthase genes*. Plant Journal 7: 661-676
- 35 96. Sawant, S.V., Singh, P.K., Gupta, S.K., Madhala, R., Tuli, R. (1999) *Conserved nucleotide sequences in highly expressed genes in plants*. Journal of Genetics 78: 123-131
97. St Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K.E., Montgomery, E., Lai, A., Riggins, G.J., Lengauer, C., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (2000) *Genes expressed in human tumor endothelium*. Science 289: 1197-202.
- 40 98. Yamamoto, Y.Y., Tsuji, H., Obokata, J. (1995) *5'-leader of a photosystem I gene in Nicotiana glauca, contains a translational enhancer*. J Biol Chem 270: 12466-70.

Los ejemplos anteriores no son limitantes, son meramente representativos de varios aspectos de las realizaciones de la presente invención. Toda la documentación que se cita indica los niveles de competencia en la técnica a la que pertenece la invención.

- 45 Una persona experta en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención está adaptada para llevar a cabo el objeto, la finalidad y las ventajas mencionados, y los inherentes a ellos. Los métodos y las composiciones que se describen en el presente documento ilustran realizaciones preferidas, son ejemplos, y no se proponen como limitaciones del alcance de dicha invención.

- 50 La invención que se describe de forma ilustrativa, se puede poner en práctica debidamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no son explicitados en el presente documento. Los términos y las expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no se tiene intención, con el uso de estos términos y expresiones, de excluir ningún equivalente de las características mostradas o descritas, o partes de ellas. Se reconoce que algunas modificaciones son posibles dentro del alcance de la invención reivindicada. Así pues, se debe entender que, aunque la presente invención se ha descrito en base a realizaciones preferidas, personas expertas en la técnica pueden recurrir a características opcionales,

- 5 modificaciones o variaciones de los conceptos descritos en el presente documento.

Además, donde las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos Markush o de otras alternativas agrupadas, las personas expertas en la técnica reconocerán que la invención también está descrita en términos de miembros individuales, o miembros de subgrupos, dentro del grupo Markush, u otro grupo, y de exclusión de miembros individuales donde corresponda.

10

5

REIVINDICACIONES

- 1 Una proteína quimérica de receptor de toxina formada por:
un complejo inmunoglobulínico, que a su vez está compuesto por al menos un fragmento de cadena pesada de la inmunoglobulina G (IgG) y
una proteína de morfogenia capilar 2 (CMG2) de la proteína de receptor de la toxina del carbunco, a la que le faltan los residuos de aminoácidos de SEC ID N.º: 102, unidos por enlaces covalentes con la cadena pesada de la IgG, o un fragmento de la misma.
- 2 Una proteína quimérica de receptor de toxina, como indicado en la reivindicación 1, en forma de dímero con otro receptor quimérico de toxina de la reivindicación 1.
- 3 Una proteína quimérica de receptor de proteína, de las reivindicaciones 1 o 2, cuyo complejo inmunoglobulínico está formado, además, por un fragmento de una cadena ligera de inmunoglobulina, preferiblemente una cadena kappa o lambda.
- 4 Una proteína quimérica de receptor de toxina, de las reivindicaciones 1 a 3, cuya cadena pesada de IgG, o un fragmento de la misma, y a cuya CMG2 de la proteína de receptor de la toxina del carbunco le faltan los residuos de aminoácidos de SEC ID N.º: 102, que están unidos por enlace covalente por medio de la unión (Gly₃Ser)₃.
- 5 Una proteína quimérica de receptor de proteína, descrita en las reivindicaciones anteriores, cuyo dominio Cy1 de la cadena pesada de IgG se omite.
- 6 Una proteína quimérica de receptor de toxina, de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el enlace covalente entre la CMG2 de la proteína de receptor de la toxina del carbunco y la cadena pesada de IgG es la bisagra de inmunoglobulina.
- 7 Una proteína quimérica de receptor de toxina, descrita en las reivindicaciones anteriores, cuyo fragmento de la cadena pesada de IgG solo contiene las regiones constantes 2 y 3 de la cadena pesada.
- 8 Una proteína quimérica de receptor de toxina, descrita en las reivindicaciones anteriores, donde la cadena pesada de IgG y la proteína del receptor de la toxina del carbunco son proteínas humanas.
- 9 Una proteína quimérica de receptor de toxina, descrita en las reivindicaciones anteriores, donde la proteína quimérica CMG-IgG tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 114
- 10 Una composición formada por una CMG2 de una proteína quimérica de receptor de toxina, de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9, y por material de planta.
- 11 Una composición, como la descrita en la reivindicación 10, cuyo material de planta sea seleccionado dentro del siguiente grupo: paredes de células de planta, orgánulos de plantas, citoplasma de plantas, células de planta intactas, semillas de plantas y plantas viables.
- 12 Un método para reducir la unión de un antígeno de carbunco a una célula hospedadora in vitro. El método consiste en: poner en contacto al antígeno de carbunco con la proteína quimérica de receptor de toxina de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9, donde la proteína quimérica de receptor de toxina se une al antígeno de carbunco y se reduce la unión del antígeno de carbunco con la célula hospedadora.
- 13 Una proteína quimérica de receptor de toxina, descrita en las reivindicaciones de 1 a 9, para utilizar como medicamento sobre pacientes o animales.
- 14 Una proteína quimérica de receptor de toxina, descrita en las reivindicaciones de 1 a 9, para utilizar en la prevención o en el tratamiento contra la infección por carbunco, o contra los efectos de la toxina del carbunco.
- 15 Un vector de expresión que codifica para la CMG2 de la proteína quimérica de receptor de toxina, según se describe en las reivindicaciones de 1 a 9.
- 16 Un método de producción de una proteína quimérica de receptor de toxina, de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9, que esté formado por la introducción de un vector de expresión de la reivindicación 15 en una célula hospedadora; y la expresión del complejo inmunoglobulínico y de la CMG2 de la proteína del receptor de la toxina del carbunco para formar una proteína quimérica de receptor de toxina.
- 17 Un método, indicado en la reivindicación 16, donde el hospedador es una planta.
- 18 Una composición farmacéutica formada por una proteína quimérica de receptor de toxina, descrito en las reivindicaciones de 1 a 9, y un vehículo farmacéuticamente válido.

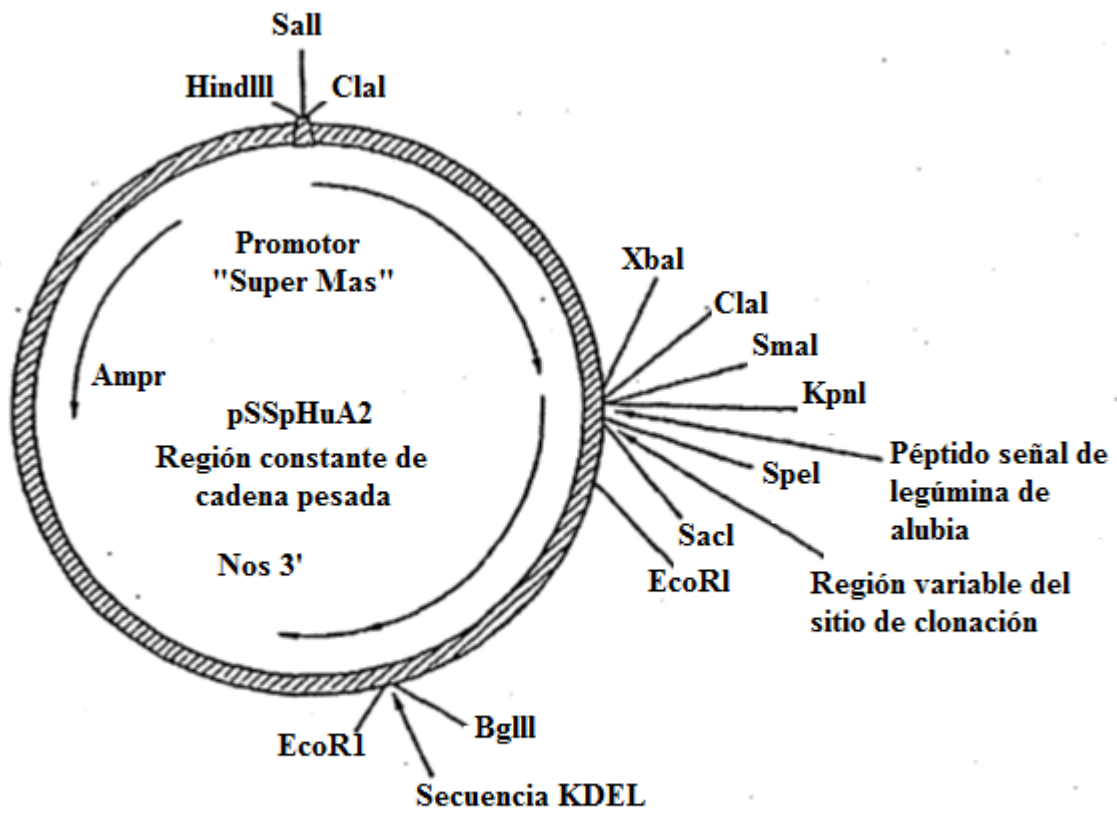


FIGURA 1

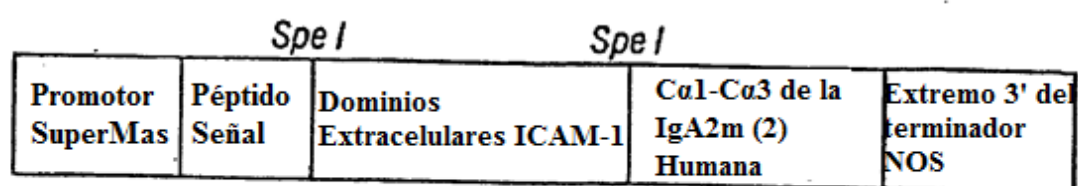
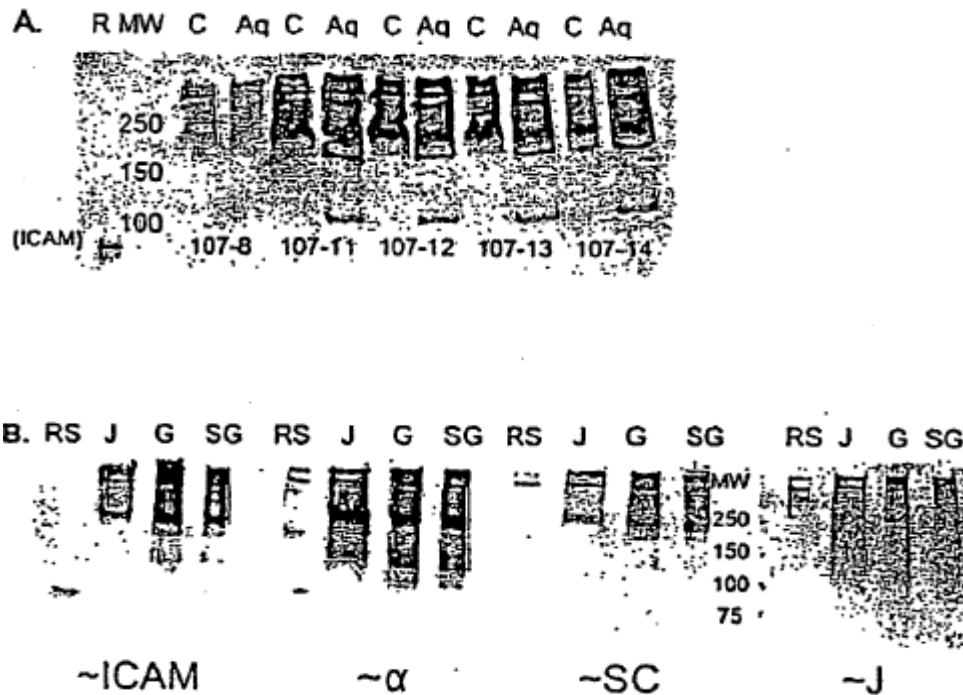
**FIGURA 2A**

FIGURA 2B

QTSVSPSKVILPRGGSVLVTCSTSCDQPKLLGISTPLPKKELLPGNNRKVVELSNVQEDSQPMCYSNCPDQOSTAKTPLTVVWTPERVELAPLPSWQPVG
 KNLTLCQVEGGA PRANLTVVLLRGEKELKREPAVGEPAEVTTTVLVRROHHGANFSCRTÉLDLRPQGLELFENTSA PYQLQTFVL PATPPQLVSPRVLEV
 DTQGTVCSLDGLFPVSEAQVHLALGDQRLNPTVYGNDSFSKASVSITAEDEQTQRLTCAVILGNQSQETLQTVITYSPAPNVILTYKEVSEGTETTV
 KCEAIIPRAKVT LNCVPAQPLGPRQAQLL KATPEDNGRFSFCSATLEVAQQLIHKNTRELRVLYGPRLDERDCPGNWTWPENSQOTPMCOAWGNPLPELKC
 LKDTFPLPIGESVTTRDLGGTYLCHARSTQGEVTRVTVNVTSGSSASPTSPKVFP LSLDSTPQDGNVVVACLVOGFFPQEPPLSVTWSESGQNVYARNF
 PPSQDASGDLVTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNSSQDVTPCRVPPPPCCHPRLSLHRRPALEDLLJGSEANLCTCTLTGLRDASGATFTWTTPSSG
 KSAVQGPPEPRLCGCYSVSRVLPGCQPFNNHGETFTCTAAHPKLKPTLANITKSGNTPRPEVHLLPPPSBELALANELVTITCLARGSPKDVLYRWLQGS
 QELPREKYLTHASROEPSQGTITYAVTSILRVAAEDWKGETFSCWVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHINVSVMAREADGTCYRSEKDEL

[SEC ID N.º: 8]

FIGURA 3

Expresión de ICAM-1-SIgA en callos de tabaco transformados individualmente. Inmunoblots de geles de SDS-PAGE no reductora, cuyas muestras, que contienen diferentes callos de tabaco transformados (C) y extractos acuosos (Aq), migran y prueban la presencia de ICAM humana (A). Los marcadores de PM están indicados, y el patrón de referencia (R) fue una mezcla (~75 ng de cada) de ICAM humana (~75 kD) y SIgA humana (>250 kD). La solubilidad del planticuerpo nos asegura que la extracción se podría realizar fácilmente y la similitud de las señales nos lleva a creer en la reproducibilidad de la expresión. B. Inmunoblots de geles de SDS-PAGE no reductora que contienen varias fracciones del planticuerpo parcialmente purificado a partir de callos Rhi107-11. J = jugo, G = fracción G-100, SG = fracción G-100 esterilizada por filtración (el que se utiliza en ensayo ECP) y RS = una mezcla de patrones de referencia de SIgA humana (75 ng) y de ICAM-1 humana (75 ng). Las transferencias se sondearon con anticuerpos frente a la ICAM humana (~ICAM), la cadena pesada de la IgA humana (~α), el componente secretor humano (~SC) y la cadena J humana (~J). En segundo lugar, se usaron anticuerpos conjugados con enzimas según necesidad para etiquetar las bandas inmunopositivas con fosfatasa alcalina. La especificidad del inmunoblotting se comprueba por un fallo en la detección de bandas inmunopositivas en extractos de callos no expresables (no se muestra). El PM esperado para una ICAM-1 dimerizada, sin glicosilación, es de 173.318; es probable que esta forma esté presente en la banda que migra justo por debajo de los marcadores de 250 kD, pues es inmunopositiva para el ICAM-1 y la cadena pesada. Esta banda también es inmunopositiva para el SC (PM total esperado de ~248 kD) pero no para la cadena J, algo inesperado, en cierto modo, teniendo en cuenta la vía canónica para la asociación de la SIgA, lo que implica dos tipos celulares (para mamíferos) y necesita de la presencia de cadena J antes de asociarse al SC. Una inmunoadhesina tetramérica, que contenga una sola molécula de cadena J y una sola molécula de SC, tiene un PM esperado de ~440 kD, previo a la glicosilación. Hay evidencias de varias especies con pesos moleculares muy por encima de los 200 kD, que son inmunopositivas según el método de las cuatro puntas.

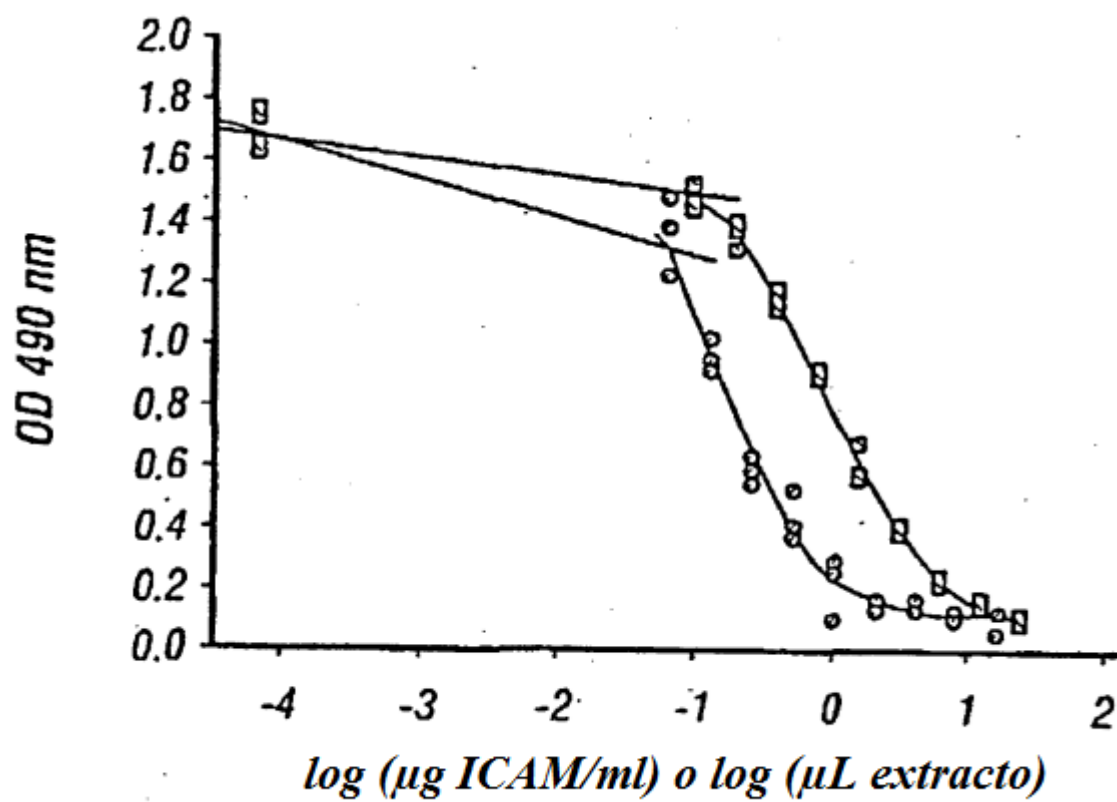


FIGURA 4

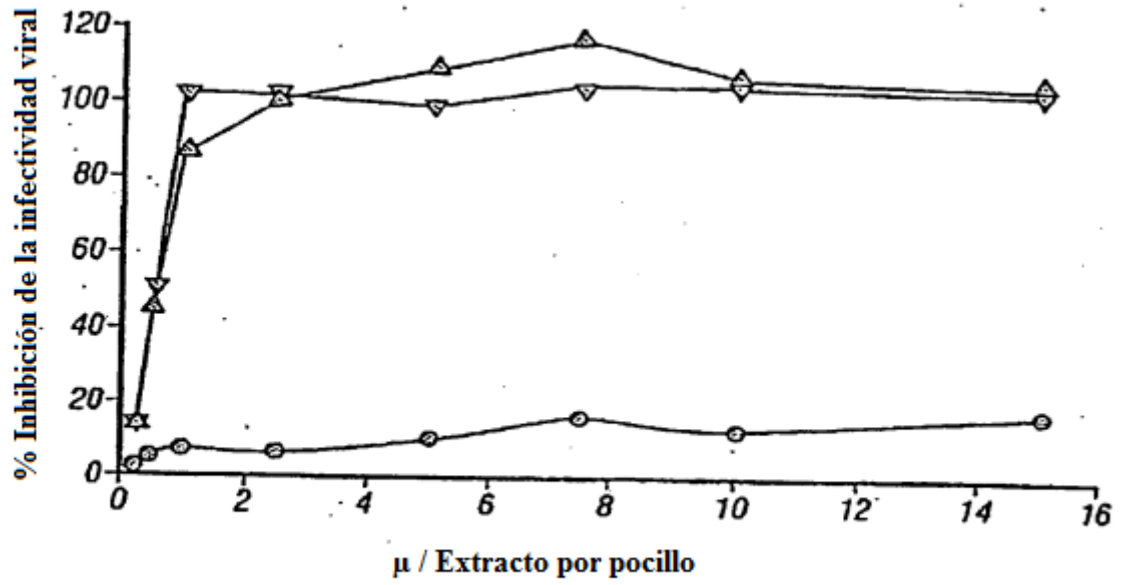


FIGURA 5A

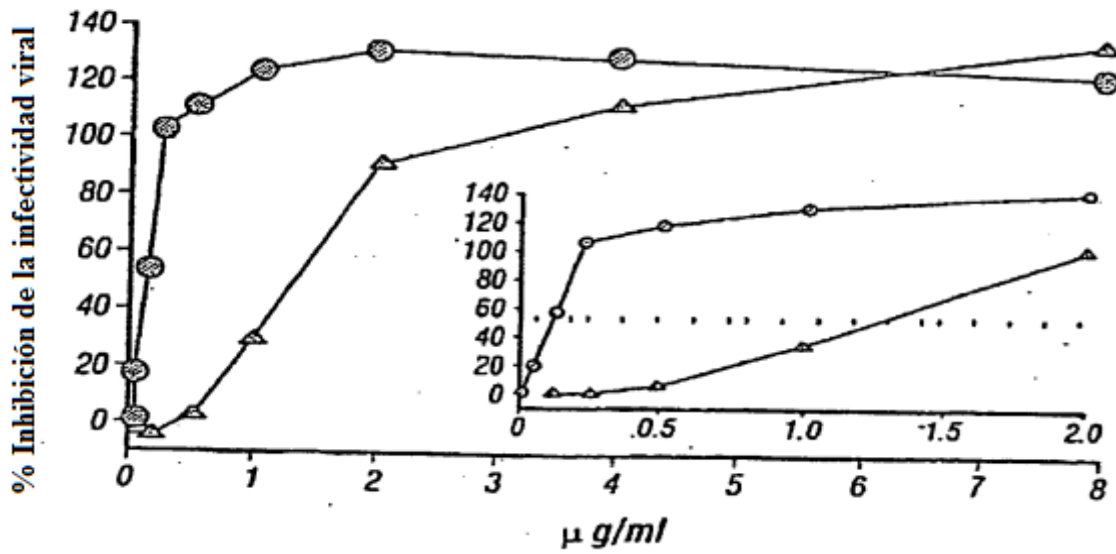


FIGURA 5B

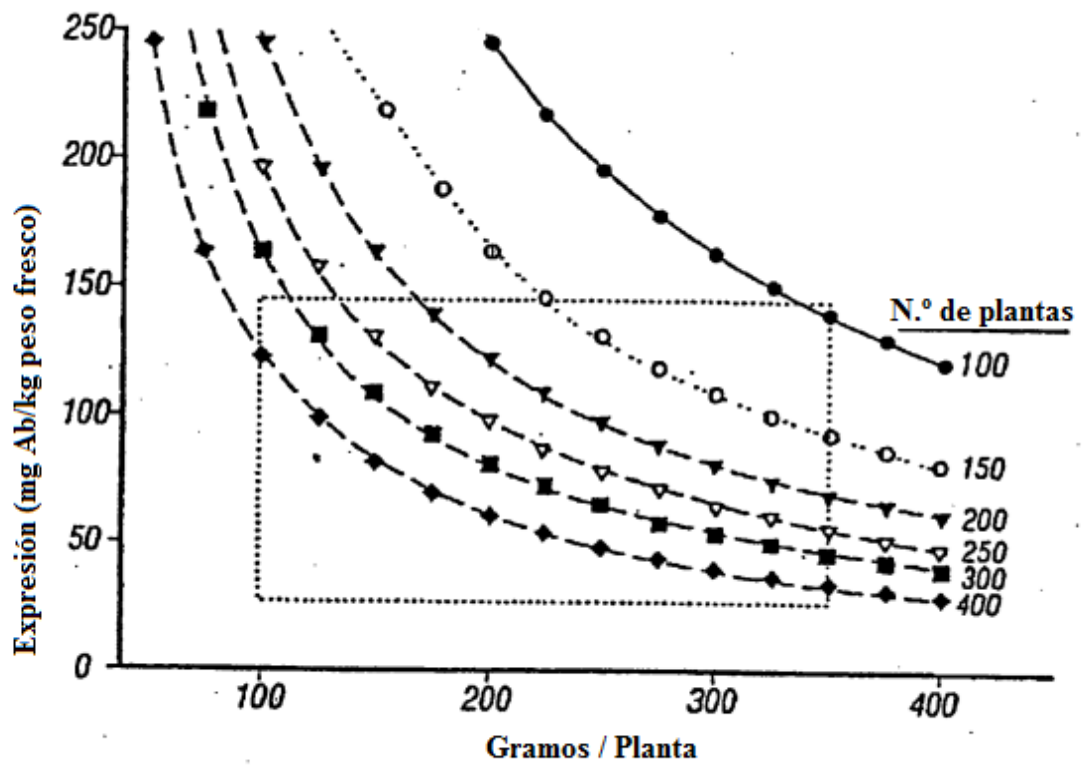


FIGURA 6

FIGURA 7A

I. REGIÓN C- α -1 DE LA IG HUMANA - HOMO SAPIENS (HUMANO)

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

>sp | P01376 | REGIÓN C CADENA ALFA-1 IG HUMANA ALC1 – Homo sapiens (Humano).

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
ASPTSPKVFP LSLCSTQPDG NVVIACLVOG FFPQEPLSVT WSESGQGVTA RNFPPSQDAS
      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
GDLYTSSQL TLPATQCLAG KSVTCHVKHY TNPSQDVTVP CPVPSTPPTP SPSTPPTPSP
      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
SCCHPRLSLH RPALEDLLLG SEANLYCTILT GLRDASGVTF TWTPSSGKSA VQPPPERDLC
      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
GCYSVSSVLP GCAEPWNHGK TFTCTAAYPE SKTPLTATLS KSGNTFRPEV HLLPPPSEEL
      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
ALNELVTLTC LARGFSPKDV LVRWLQGSQE LPREKYL TWA SRQEPSQGT TFAVTSILRV
      310     320     330     340     350
      |      |      |      |      |
AAEDWKKGDT FSCMVGHEAL PLAFTQKTID RLAGKPTHVN VSVVMAEVDG TCV

```

[SEC ID N.º: 16]

SECUENCIA DE CODIFICACIÓN

```

      9      -1
catccccgac cagccccaag gtcttcccg ctagcctctg cagcaccag ccagatggga 60
acgtggcct cgcctgctg gtccagggc tcttccccca ggagccactc agtgtgacct 120
ggagcgaaa cggacagggt gtgaccgcca gaaacttccc acccagccag gatgcctccg 180
gggacctgt caccacagagc agccagctga cctgtccggc cacacagtgc ctgaccggca 240
agtccgtgac atgccacgtg aagcattaca cgaatcccag ccaggatgtg actgtgccct 300
gcccagctcc ctcaactcca cctaccctac ctctctcaac tccacctacc ccatctcccc 360
catgtgcca cccccgactg tcaactgacc gaccggccct cgaggacctg ctcttaggtt 420
cagaagcgaa cctcacgtgc acactgaccg gacctgagga tgcttcaggt gtcaccttca 480
cctggacgac ctcaagtggg aagagcgtg tccaaggacc acctgagcgt gacctctgtg 540
gtgtctacag cgtgtccagt gtcttgcgg gtgtgcccga gccatgggac catgggaaga 600
ccttcaattg cactgtgtgc taccctcagt ccaagacccc gctaaccgcc acctctcaa 660
aatccggaaa cacattccgg cccgagggtc acctgtgtcc gccgcccgtg gaggagctgg 720
ccttgaacga gctgggtgac ctgactgtcc tggcacggcg ctccagcccc aaggacgtgc 780
tgggtcgtg gctgcagggt tcacaggagc tgcctcgcca gaagtacctg acttgggcat 840
cccggcagga gcccagccag ggcaccacca ccttcgtgtg gaccagcata ctgcgcgtgg 900
cagccgagga ctggaagaag ggggacacct tctcttgcac ggtggggcac gaggccctgc 960
cgtcggcctt cacacagaag acctatgacc gcttggcggg taaccctacc catgtcaatg 1020
tgtcgtctg catggcggag gtggacggca cctgtactg a 1061

```

[SEC ID N.º: 15]

GenBank

J00220
 LOCUS HUMIGCC8 2533 bp ADN PRI 02-DIC-1998
 DEFINICIÓN Región constante de la cadena pesada alfa-1 de la inmunoglobulina de homo sapiens (gen IGHA1), SCD parcial.
 N.º ACCESO J00220
 VERSIÓN J00220.1 GI: 184743
 PALABRAS CLAVE -
 FUENTE humano
 ORGANISMO Homo sapiens

FIGURA 7B

	Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos; Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.			
REFERENCIA	1 (bases 1 a 2533)			
AUTORES	Takahashi, N. , Ueda, S. , Obata, M. , Nikaido, T. , Nakai, S. y Honjo, T.			
TÍTULO	Structure of human immunoglobulin gamma genes: Implications for evolution of a gene family			
REVISTA	Cell 29, 671-679 (1982)			
MEDLINE	83001943			
COMENTARIO	Esta secuencia forma parte de una región multigénica que contiene los genes de la cadena pesada de inmunoglobulina gamma-3, gamma-1, pseudo-épsilon y alfa-1.			
CARACTERÍSTICAS	Situación/Calificadores			
fuelle	1..2533 /organismo = "Homo sapiens" /db_xref = "taxón: 9606" /cromosoma = "14" /mapa = "14q32.33" /clon = "cosmid Ig13; Ig-gamma3-122" /tipo_tejido = "placenta; hígado" /germline			
intrón	<1..141 /nota = "alfa-1 intrón J-C"			
exón	142..447 /gen = "IGHA1"			
gen	<142..>1638 /gen = "IGHA1"			
SCD	unión a (<142..447,662..1021,1244..1638) /gen = "IGHA1" /comienzo_codón = 3 /producto = "región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina alfa-1" /n_proteína = "AAC82528.1" /db_xref = "GI = 184749" /translation = "SPTSPKVPPLSLCSTOPDGNVVIACLVGQFFPQEP LSVTNSES OGVTARNFPSPQDASGDLTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVP PSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTF WTPSSGKSAVQGPPEPDLGCGYSVSSVLPGCAPWNGKTFCTAAYPESKTPLTATL SKSGNTFRPEVHLLPPSEELALNELVLTCLARGFS PKDVLVRWLQSQELPREKYL TWASRQEPESQITTFVATSI LRVAEDWKKGDTFSCHVGHEALPLAFTQKTI DRLAGK PTHVNVSVVMAEVDGTCY"			
intrón	448..661 /gen = "IGHA1" /nota = "A"			
axón	662..1021 /gen = "IGHA1"			
intrón	1022..1243 /gen = "IGHA1" /nota = "B"			
exón	1244..>1638 /gen = "IGHA1"			
CONTADOR BASE	490 a	866 c	753 g	424 t
ORIGEN	<pre> 1 ggtccaaactg caggccctgtg gtgcaggagc tgtgtgacca tggggctgtc accaggccctc 61 tctgtgctgg gtccctccag tatagaggag aggcagcata gaggagaggg ccgcgtccctc 121 acagctgcat ctgtgttcca gcatccctga ccagcccca ggtcttcccg ctgagcctct 181 gcagcaccca gccagatggg aacgtggtca tgcctgctc ggtccagggc tctctccccc 241 aggagccact cagtgtgacc tggagcgaaa gcggacaggg cgtgaccgcc agaaacttcc 301 caccacagcca ggaagccctc ggggacctgt accaccagag cagccagctg accctgcccg 361 ccacacagctg cctagccggc aagtcctgga catgccacgt gaagcactac acgaatccca 421 gccaggatgt gactgtgccc tgcctaggtc agagggcagg ctggggagtg gggcggggcc 481 accccgtcgt gccctgacac tgcgcttgca cccgtgtctc ccacaggagg ccgccccctc 541 actcacacca gagtggaccc cgggctgagc cccaggaggc ggtggtggac aggccaggag 601 gggcgaggcg ggggcatggg gaagtatgtg ctgaccagct caggtccatc ctccactcca 661 gtccctccaa ctccactac cccatctccc tcaactccac ctacccatc tccctcatgc 721 tgcacccccc gactgtcact gcaccgaccg gccctcgagg acctgtctct aggttcagaa 781 gcgaacctca cgtgcacact gaccggcctg agagatgctc cagggtgtcac ctccacctcg </pre>			

FIGURA 7C

```

841 acgcccctcaa gtgggaagag cgtgtgttcaa ggaccacctg agcgtgacct ctgtggctgc
901 tacagcgtgt ccagtgtctt gccgggctgt gccgagccat ggaaccatgg gaagaccttc
961 acttgccactg ctgcctacct ctagtccaaag accccgctaa ccgccacctt ctcaaaatcc
1021 ggtgggtcca gacctgtctt ggggcccctgc tcagtgtctt ggtttgcaaa gcatattctt
1081 ggectgcctc ctccctccca atcctgggct ccagtgtctt tgcgaagtac acagggaaac
1141 tgaggcaggc tgagggggcca ggacacagcc cggggtgccc accagagcag aggggctctc
1201 tcatccctcg cccagcccc tgacctggtt ctctaccttc caggaaacac attccggccc
1261 gaggtccacc tgcgtgcgcc gccgtcgag gagctggccc tgaacgagct ggtgacgtgc
1321 acgtgcctgg cagcgcgctt cagccccaaag gacgtgtctg ttctgtggct gcaggggtca
1381 caggagctgc cccgcgagaa gtacctgact tgggcatccc ggaggagcc cagccagggc
1441 accaccacct tcgctgtgac cagcatactg cgcgtggcag ccgaggactg gaagaagggg
1501 gacaccttct cctgcatggg gggccacgag gccctgccc cggccttcac acagaagacc
1561 atcgaccgct tggcgggtaa acccaccat gtcaatgtgt ctgtgtcat ggcggaggtg
1621 gacggcacct gctactgagc cgcctgcttg tcccacccc tgaataaact ccatgtctcc
1681 ccaagcagcc ccacgcttcc atccggcgcc tgtctgtcca tcctcagggt ctcagacctt
1741 gggaaagggc cagggcattg acagggagaa ataccctctg ccctgagcct cggggggccc
1801 ctggcaccct catgagactt tccacctctg tgtgagtgtg agttgtgagt gtcagagtgt
1861 gtgtgtcagg aggcctctgt ggtgtgagat cttaggctct ccaaggcagg cacagcccag
1921 gatgggttct gagagacgca catgccccgg acagtctctg gtgagcagtg gcatggcctg
1981 ttgtccctga gagagccgct tctggctgta gctgggaggg aatagggagg gtaaaaggag
2041 caggctagcc aagaaaggcg caggtagtgg caggagcggc gagggagtga ggggctggac
2101 tccaggggcc cactgggagg acaagctcca ggggggccc accacccctag tgggtgggccc
2161 tcaggacgtc ccactgacgc atgcaggaag gggcacctcc ccttaccac actgtctgt
2221 acggggcacg tgggcacagg tgcacactca cactcacata tatgcttgag cctgtcagga
2281 gcggaaagct caccagccag acccagctcc agaaaaagca ggggagctcc ctcccaagcc
2341 cccaagctca gctgtctccc ctaggccctt ctggcttccc tgtgttcca ctgtgcacag
2401 atcaggaccc aactccacag acccttccca ggcagccctt gctccctgcc tggccaagtc
2461 tcccatcccc tcctaaagcc aactaggacc caaagcatag acagggaggg gccacgtggg
2521 gtggcatcag aag

```

[SEC ID N.º: 52]

II. REGIÓN C DE CADENA DE LA IG ALFA-2 HUMANA - HOMO SAPIENS (HUMANO)

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

>sp | P01877 | ALC2_REGIÓN C DE CADENA DE LA IG ALFA-2 HUMANA - Homo sapiens (Humano)

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
ASPTSPKVFP LSLDSTPQDG NVVVACLVOG FFPQEP LSVT WESGQNVTA RNFPPSQDAS
      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
GDLYTTSSQL TLPATQCPDG KSVTCHVQHY TNPSQDVTVP CPVPPPPPC HPRLSLHRPA
     130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
LEDLLLGSEA NLTCTLTGLR DASGATFTWT PSSGKSAVQG PPERDLGCGY SVSSVLPGCA
     190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
QPWNHGETFT CTAAPPELKT PLTANITKSG NTRPEVHLL PPPSEELALN ELVTLTCLAR

```

FIGURA 7D

```

      250      260      270      280      290      300
      |       |       |       |       |       |
GFSPKDVLR WLQSQELPR EKYLWASRQ EPSQGITTTFA VTSILRVAAE DWKKGDTFSC
      |       |       |       |
      310      320      330      340
      |       |       |       |
MVGHEALPLA FTQKTIDRLA GKPTHVNVSV VMAEVDGTCY

```

[SEC ID N.º: 18]

SECUENCIA DE CODIFICACIÓN

```

catcccccgaac cagccccaag gtcttctccgc tgaagctcga cagcaccccc caagatggga      9      -1
acgtgggtcgt cgcattgctg gtccagggtc tcttcccccga ggagccactc agtgtgacct      60
ggagcgaaag cggacagaac gtgaccgcca gaaacttccc acctagccag gatgctcccg      120
gggacctgtg caccacgagc agccagctga ccttgccggc cacacagtgc ccagacggen      180
agtccgtgac atgccacgtg aagcactaca cgaatcccag ccaggatgtg actgtgccct      240
gtccagtccc cccacctccc ccatgctgcc accccgact gtctgtgca cgaaccggccc      300
tcgaggacct gctcttaggt tcagaagcga accctcacgtg cacactgacc ggcctgagag      360
atgctctcgg tgcacacctc acctggacgc cctcaagtgg gaagagcgtg gttcaaggac      420
cacttgagcg tgacctctgt ggctgttaca gcgtgtccag tgcctgctt ggctgtgccc      480
agccatggaa ccatggggag accttcacct gcactgtctg ccaaccgag ttgaagacct      540
cactaaccgc caacatcaca aatccggaa acacattccg gcccgaggtc cactgtctgc      600
cgccgcgctc ggaggagctg gccctgaaag agctgggtgac gctgacgtgc ctggcacgtg      660
gcttcagccc caaggatgtg ctgggtcgtc ggctgtcagg gtcacaggag ctgcccgcg      720
agaagtcact gacctgggca tcccggcagg agccctagcca gggcaccacc accttcgctg      780
tgaccagcat actgcgctgt gcagccgagg actggaagaa gggggacacc ttctctgca      840
tggtgggcca cgaaggccctg ccgctggcct tcacacagaa gaccatcgac cgtctggcgg      900
gtaaaccca ccatgtcaat gtgtctgttg tcatggcgga ggtggacggc acctgtact      960
ga                                         1020

```

[SEC ID N.º: 17]

GenBank

J700221	Ig humana de germline
LOCUS	HUMIGCD7 2516 bp ADN PRI 11-ABR-2001
DEFINICIÓN	Cadena H de Ig humana de germline constante de alelo extremo 3'.
N.º ACCESO	J00221
VERSIÓN	J00221.1 GI:184756
PALABRAS CLAVE	-
ORGANISMO	humano
FUENTE	Homo sapiens
REFERENCIA	Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos; Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.
AUTORES	1 (bases 1 a 2516)
TÍTULO	Ellison.J. y Hood. L.
REVISTA	Linkage and sequence homology of two human immunoglobulin gamma heavy chain constant region genes
MEDLINE	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 (6), 1984-1988 (1982)
PUBMED	82197621
REFERENCIA	2 (bases 737 a 1016)
AUTORES	Flanagan.J.G. y Rabbitts.T.H.
TÍTULO	Arrangement of human immunoglobulin heavy chain constant region genes implies evolutionary duplication of a segment containing gamma, epsilon and alpha genes
REVISTA	Nature 300 (5894). 709-713 (1982)
MEDLINE	83088998
PUBMED	6817141
REFERENCIA	3 (bases 49 a 229; 425 a 514)
AUTORES	Hisajima, H., Nishida, Y., Nakai, S., Takahashi, N., Ueda, S. and Honjo, T.
TÍTULO	Structure of the human immunoglobulin C epsilon 2 gene, a truncated pseudogene: implications for its evolutionary origin
REVISTA	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80 (10), 2995-2999 (1983)
MEDLINE	83221529

FIGURA 7E

PUBMED	6407005
REFERENCIA	4 (bases 1 a 2516)
AUTORES	Flanagan, J.G., Lefranc, M.P. y Rabbitts, T.H.
TÍTULO	Mechanisms of divergence and convergence of the human immunoglobulin alpha 1 and alpha 2 constant region gene sequences
REVISTA	Cell 36 (3), 661-688 (1984)
MEDLINE	84130179
PUBMED	6421489
COMENTARIO	(3) también informa sobre el gen alfa-1 completo y parte del alelo alfa-2 A2m (2) (bases 737-2516; véase Tabla de sitios). La comparación de las tres secuencias sugiere que el alelo alfa-2 A2m (1) podría ser un híbrido del gen alfa-1 y del alelo alfa-2 A2m (2). La región bisagra de los genes alfa está al principio del dominio CH2. La región bisagra alfa-1 tiene 13 aminoácidos más que la de alfa-2. Ambas regiones bisagra están formadas por repeticiones en tándem de una secuencia aproximada de 15 bps. La primera repetición se produce en el extremo 5' del mRNA del sitio de unión, y no es codificante. Los autores (3) sugieren que esta estructura repetitiva proporciona un mecanismo posible para el gran número de variaciones observadas en las regiones bisagra. Hay una inserción de 30 bp acopladas, delección de 2 bp en alfa-2 en relación a alfa-1 (a partir de base 97). (1) también informa sobre los genes de región C épsilon-1 y épsilon-2 (pseudogén). Los autores (1) determinaron la unión física entre épsilon-1 y alfa-2, y entre épsilon-2 y alfa-1. (2) también informa del dominio CH2 alfa y épsilon-2. Esta entrada es parte de una región multigénica (región B), que incluye los genes gamma-2, gamma-4, epsilon-1 y alfa-2. Véase segmento 1 para más comentarios. Fuente de información completa; ADN genómico humano, Ig10 cosmídico (1), (3); Clon H-Ig-alfa-25 de ADN placentario (2); ADN genómico de TOU II-5 biblioteca clon lambda-TOU-alfa2 (para A2m (2) alelo) (3).
CARACTERÍSTICAS	
fuelle	Situación/Calificadores 1..2516 /organismo = "Homo sapiens" /db_xref = "taxón:9606" /mapa = "14q32.33"
gen	/germline <1..1621 /gen = "IgH" /nota = "IGHA2"
intrón	<1..163 /gen = "IgH" /nota = "alfa-2 intrón J-C"
SDC	unión (<164..469.684 ..1004, 1227.. 1621) /gen = "IgH" /nota = "contiene región constante" /comienzo_codón = 3 /producto = "inmunoglobulina de cadena pesada alfa-2" /n.º_proteína = "AAB59396.1" /db_xref = "GI: 184761" /translation="SPTSPKVFPPLSLDSTPDGNNVVVACLVOGFPFQPEPLSVTHSESGQNVITARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPFVPPPPCCCHPRLSLHRPALEDLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVOGPFERDLCCCYSVSVLPGCAQPNHGETFTCTAAKPELKTPLTANITKSGNTFRPEVRL LPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTHASRQEPSQGTTFFAVTSILRVAAEDWIKGDTFSCMVGHEALPLAFTOKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEV DGTCY"
exón	164..469 " /gen = "IgH" /nota = "G00-119-333"
intrón	470..683 /gen = "IgH" /nota = "alfa = 2 intrón A"
exón	684..1004

FIGURA 7F

intrón	/gen = "IgH" 1005..1226
exón	/gen = "IgH" /nota= "alfa-2 intrón B" 1227..1621
variación	/gen = "IgH" 1434
variación	/gen = "IgH" /nota = "t en A2m (1); a en A2m (2)." 1441
variación	/gen = "IgH" /nota = "g en A2m (1); a en A2m (2)." 1465
variación	/gen = "IgH" /nota = "c en A2m (1); t en A2m (2)". 1486
variación	/gen = "IgH" /nota = "c en A2m (1); g en A2m (2)". 1553
variación	/gen = "IgH" /nota = "t en A2m (1); a en A2m (2)." 1573..1574
variación	/gen = "IgH" /nota = "tg en A2m (1); ca en A2m (2)". 1602..1606
variación	/gen = "IgH" /nota = "tggac en A2m (1); cggat en A2m (2)". 2060
variación	/nota = "c en A2m (1); t en A2m (2)". 2384
variación	/nota = "a en A2m (1); c en A2m (2)". 2390
variación	/nota = "c en A2m (1); g en A2m (2)".
CONTADOR BASE	488 a 861 c 754 g 413 t

ORIGEN

```

1 ggtcccaaccg caggcccatg gtgcaggagc tgtgtaacct atggggctgt caccaggccct
61 ctctgtgtctg ggttccctcca gtgtagaggga gaggcaggta cagcctgtcc tccctggggac
121 atggcctgag ggccgcgtcc tcacagcgca ttctgtgttc cagcatcccc gaccagcccc
181 aaggctcttcc cgctgagcct cgacagcacc cccaagatg ggaacgttgt cgtcgtatgc
241 ctgggtccagg gcttcttctcc ccaggagcca cttagtgtga cctggagcga aagcggacag
301 aacgtgaccg ccagaaacct cccacctagc caggatgctt ccggggacct gtaccaccag
361 agcagccagc tgacctgccc ggccacacag tgcccagacg gcaagtccgt gacatgccac
421 gtgaagcact acacgaatcc cagccaggat gtgactgtgc cctgccagg ttagaggcca
481 ggcctggggag tggggctggg ccacctcgct ctgcccgtgc actgcccctg caccctgtgt
541 ccccacaggg agccgccctt tcactcacac cagagtggac cccgggcccga gcccagggag
601 gtggtggtgg acaggccagg aggggctagg cgggggacag gggaaaggcg tcttgaccag
661 cttagggcat ctctccatcc cagtcccccc acctccccc cctgcccacc ccgactgttc
721 gctgcaccga ccggccctcg aggaacctgt cctagggttca gaaagcgaacc tcacgtgcac
781 acctgacctgg ctagagagatg cctctggtgc cacttccacc tggacgcccc caagtgggaa
841 gagcgtctgt caaggaccac ctgagcgtga cctctgtgtg tgtacagctg tctccagtgt
901 cctgcccctg tgtgcccagc catggaacca tggggagacc ttcacctgca ctgctgcccc
961 cctcgaagtgt aagacccacc taacctccaa catcacaaaa tccgggtgggt ccagaccttg
1021 ctgggggccc tgcctagtgc tctgggtttgc aaagcatatc cccggcctgc ctctcccttc
1081 ccaatcctgg gctccagtgc tcatgccaag tacacaggga aactgaggca ggctgagggg
1141 ccaggacaca gccacgggtg cccaccagag cagaggggct ctctcatccc ctgcccagcc
1201 ccttgacctg gctctctacc ctccaggaaa cacatctctg cccgaggttc acctgtgtgc
1261 gccgcccgtg gaggagctgg cctgaaacga gctggtgacg ctgacgtgccc tggcagctgg
1321 cttcagcccc aaggatgtgc tgggtctgct gctgcagggg tcacaggagc tggcccgcga
1381 gaagtacctg acttgggcat cccggcagga gccacgcccag ggccaccaca ccttctgtgt
1441 gaccagcata ctgcgctgtg cagccgagga ctgggaagaa ggggacaccc tctcctgcat
1501 ggtggggcac gaggccctgc cgttggccct cacacagaag accatcgacc gcttggcggg
1561 taaacccacc catgtcaatg tgtctgtctg catggcgagg gtggacggca cctgtacttg
1621 agccgcccgc ctgtccccac cctgaaataa actccatgct cccccaagca gcccacgctt
1681 tccatccggc gcttgtctgt ccactctcag ggtctcagca cttgggaagg gggcagggca
1741 tggacaggga agaatacccc ctgcccctgag cctcgggggg cccctggcac ccccatgaga
1801 .cttccacccc tgggtgtgag gtgagtgtgt agtgtgagag tgtgtggctgc aggaaggccc

```

FIGURA 7G

```

1861 gctgggtgtga gatcttaggt ctgccaagggc aggcacagcc caggatgggt tctgagagac
1921 gcacatgccc cggacagtcc tgagttagca gtggcatggc cgttcgtccc tgagagagcc
1981 gcctctgggt gtactctggga ggggaataggg agggtaaaag gagcaggcta gccaaagaag
2041 gcgcaggtag tggcaggagc ggcgagggag tgaggggctg gactccaggc cccactggg
2101 aggacaagct ccaggagggc cccaccacce tagtgggtgg gcctcaggac gtcccactga
2161 cgcattgcagg aaggggcacc tccccctaac cacactgctc tgtaaggggc acgtgggcac
2221 acatgcacac tcacactcac atatacgctc gagecctgca ggagtggaac gttcacagcc
2281 cagaccagct tccagaaaag ccaggggagt cccctcccaa gcccccaagc tcagcctgct
2341 ccccccaggc cctctggctt cctctgtgtt ccactgtgca cagatcaggc accaactcca
2401 cagacccctc ccaggcagcc cctgtctcct gcctggccaa gtctcccatc ccttccaaag
2461 cccaactagg acccaagca tagacaggga ggggcgcgt ggggtggcat cagaag

```

[SEC ID N.º: 53]

III. REGIÓN C DE LA IG GAMMA-1 HUMANA - HOMO SAPIENS (HUMANO)

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

>sp | P01857 | GC1_REGIÓN C DE LA IG GAMMA-1HUMANA - Homo sapiens (Humano)

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
GLYSLSSVVT VPSSSLOTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKHTTCP PCPAPELLGG
      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
PSVFLPPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKQPREPO VYTLPPSRDE
      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
LTQNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
      310     320     330
      |      |      |
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

[SEC ID N.º: 20]

SECUENCIA DE CODIFICACIÓN

```

cctccacca gggcccatcg gtcttccccc tggcacccctc ctccaagagc acctctgggg          9
gtacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acggtgtcgt        60
ggaaactcagg cgccttgacc agcggcgctgc acaccttccc ggcctgtccca cagtctctcag       120
gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct       180
acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca       240
aatcttgtga caaaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac       300
cgtcagctctt cctcttcccc ccaaaaacca aggaacacct catgatctcc cggaccctctg       360
aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaa gttcaactggt       420
acgtggacgg cgtggggtgtg cataatgcca agacaagacc gcgggaggag cagtacaaca       480
gcacgtaccg ggtgggtcagc gtcttcacccg tctctgacca ggaactggctg aatggcaggg       540
agtcacaagt cagggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca       600
aagccaaaagg gcagcccccga gaaccacagg tgtacacctt gcccccatcc cgggatgagc       660
tgaccaagaa ccagggtcagc ctgacctgct tgggtcaagg ctctctatccc agcagacatcg       720
ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc       780
tggactccga cggctctctc tctctctaca gcagctcac cgtggacaa gacaggtggc       840
agcaggggaa cgtcttctca tgctcctgta tgcattgaggc tctgcacaa cactacacgc       900
agaagagcct ctccccgtct ccgggtaaat ga                                     960

```

FIGURA 7H

[SEC ID N.º: 19]

GenBank

J700228

LOCUS

DEFINICIÓN

N.º ACCESO

VERSIÓN

PALABRAS CLAVE

ORGANISMO

FUENTE

REFERENCIA

AUTORES

TÍTULO

REVISTA

MEDLINE

COMENTARIO

CARACTERÍSTICAS

fuente

gen

intrón

SDC

diferencia_misc

diferencia_misc

diferencia_misc

diferencia_misc

diferencia_misc

diferencia_misc

HUMIGCC4 2009 bp

ADN

PRI

02-DIC-1998

Región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina gamma-1 de homo sapiens (gen IGHG1) Scod. Parc.

J00228

J00228.1 GI:184739

-

humano

Homo sapiens

Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos;

Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.

1 (bases 1 a 2009)

Takahashi, N. , Ueda, S. , Obata, M. , Nikaido, T. , Nakai, S. y Honjo, T.

Structure of human immunoglobulin gamma genes: Implications for evolution of a gene family

Cell 29, 671-679 (1982)

83001943

Esta secuencia forma parte de una región multigénica que contiene los genes de la cadena pesada de inmunoglobulina gamma-3, gamma-1, pseudo-épsilon y alfa-1.

Situación/Calificadores

1..2009

/organismo = "Homo sapiens"

/db_xref = "taxón: 9606"

/cromosoma = "14"

/mapa = "14q32.33"

/clon = "cósmido Ig13; Ig-gamma3-122"

/tipo_tejido = "placenta; hígado"

/germline

<1..>1803

/gen = "IGHG1"

<1..209

/gen = "IGHG1"

unión (<210..503, 892..936, 1055..1384, 1481..1803)

/gen = "IGHG1"

/comienzo_codón = 3

/producto = "región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina gamma-1 "

/n_proteína = "AAC82527.1"

/db_xref = "GI: 184747"

**/translation="STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIQLVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
 DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPCK"**

563

/gen = "IGHG1"

/sustituir = " "

593

/gen = "IGHG1"

/sustituir = " "

614

/gen = "IGHG1"

/sustituir = " "

633

/gen = "IGHG1"

/sustituir = " "

643

/gen = "IGHG1"

/sustituir = " "

654

/gen = "IGHG1"

FIGURA 7I

diferencia_misc /sustituir = " "
684
/gen = "IGHG1"
/sustituir = " "
diferencia_misc 692
/gen = "IGHG1"
/sustituir = " "
diferencia_misc 765...766
/gen = "IGHG1"
/sustituir = " "
diferencia_misc 1475
/gen = "IGHG1"
/sustituir = " "
diferencia_misc 1578
/gen = "IGHG1"
/sustituir = " "

CONTADOR BASE 418 a 698 c 566 g 327 t

ORIGEN

```

1 agctttctgg ggcaggccag gcttgacctt ggctttgggg caggaggggg gctaagggtga
61 ggcaggctggc gccagcagggt gtacacccaa tgcccctgag cccagacact ggacgctgaa
121 cctcgcggac agttaagaac ccaggggcct ctgcgcctgg gccagctct gtcccacacc
181 gcgggtcacat ggcacacact ctcttgacag ctccaccbaa ggcccatcgg tcttccccct
241 ggcacccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgct tggtaaggga
301 ctacttcccc gaaccggtga cggctgctgt gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca
361 cacttccccg gctgtccctac agtcttcagg actctactcc ttcagcagcy tggtgaccgt
421 gccctccagc agcttggggca cccagacctt catctgcaac gtgaatcaca agccacagcaa
481 caccaaagggtg gaccaagaaa ttggtgagag gccagcacag ggaaggaggg tgtctgctgg
541 aagcaggctcc agcgtctctg cctggagcga tcccggtctat gcagccccag tccagggcag
601 caaggcaggc cccgtctgct tcttcacccg gagcctctgc ccgccccact catgctcagg
661 gagagggtct tctggcttct tcccaggctc tgggcaggca caggctagggt gcccctaac
721 caggccctgc acacaaaggg gcagggtgct ggctcagacc tgccaaggagc catatccggg
781 aggaacctgc ccttgacctt agcccacctc aaaggccaaa ctctccactc cctcagctcg
841 gacaccttct ctctccctag attcagtaa ctcccaatct tctctctgca gagcccaaat
901 cttgtgacaa aaactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag gcctcgccct
961 ccagctcaag gcgggacagg tgcccctagag tagcctgcat ccagggacag gcccagccg
1021 ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacttg aactcctggg gggaccgtca
1081 gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac acctcatga tctcccgac ccttgaggte
1141 acatgctggt tgggtggaggt gagccacgaa gaccttgagg tcaagttcaa ctggtacgtg
1201 gacggcgtcg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg agggagcagta caacagcacg
1261 tacggggtgg tccagctctt caccgtcttg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag
1321 aagtgcaagg tctccacaaa agccctccca gcccctatcg agaaaacctt cttcaaaagg
1381 aaagggtggga cccgtggggg gcgaggggcca catggacaga ggccgggtcg gcccaacctc
1441 tgccctgaga gtgaccgtg taaccaacct tgtctctacg ggcagccccg agaaccatag
1501 gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggttag cctgacctgc
1561 ctgggtcaaa gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg
1621 gagaacaaat acaagaccac gcttcccgtg ctggactccg acggctcctt ctctctctac
1681 agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg cagcaggggg acgtcttctc atgctccgtg
1741 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
1801 tgagtgcgac ggccggcaag ccccgctccc cgggctctcg tggctcgacg aggatgcttg
1861 gcactgaccc cctgtacata ettcccgggc gcccaagcat gaaaataagc acccagcgct
1921 gccctggggc cctgcgagac tgtgatgggt ctttccacgg gtcaggccga gtctgaggcc
1981 tgagtggcat gagggaggca gagcgggtc

```

[SEC ID N.º: 54]

IV. REGIÓN C DE LA IG GAMMA 2 HUMANA - HOMO SAPIENS (HUMANO)

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

>sp | P01859 | GC2_REGIÓN C DE LA IG GAMMA-2HUMANA - Homo sapiens (Humano)

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTPFAVLQSS
      70      80      90     100     110     120

```

FIGURA 7J

```

      |      |      |      |      |      |
GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KCCVECPPCP APPVAGPSVF
      |      |      |      |      |      |
      130      140      150      160      170      180
LFPPIKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR
      |      |      |      |      |      |
      190      200      210      220      230      240
VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN
      |      |      |      |      |      |
      250      260      270      280      290      300
QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQQPENNY KTTTPMLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
      |      |      |
      310      320      326
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

```

[SEC ID N.º: 22]

SECUENCIA DE CODIFICACIÓN

```

gctccacca agggcccatc ggtcttcttc ctggcgccct gctccaggag cactccgag      60
agcacagccg ccttgggctg cctgggtcag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      120
tggaaactcag gcgctctgac cagcggtgtg cactacttcc cagctgtcct acagtcctca      180
ggactctact ccttcagcag cgtgggtgacc gtgccttcca gcaacttcgg caccagacc      240
cacacctgca acgtagatca caagccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc      300
aaatgtctgt tcgagtgcct accgtgccc gacacacctg tggcaggacc gtcagtcttc      360
ctcttcccc caaaaccbaa ggacaccttc atgatctccc ggacctctga ggtcacgtgc      420
gtgggtgggtg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc      480
gtggagggtgc ataargccaa gacaaaagcta cgggaggagc agttcaacag cactgtctgt      540
gtggtcagcg tcttcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaaggga gtacaagtgc      600
aaggctctca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ctatctccaa aaccaaaagg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccttg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc tcttacccea gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac      840
ggctctcttc tctctctacag caagctcacc gtggcaagga gcaggtagga gcagggggaa      900
gtcttctcat gctcgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      960
tctctgtctc cgggtaaa

```

[SEC ID N.º: 21]

GenBank

J00230	Ig humana de germline			
LOCUS	HUMIGCD1 2009 bp	ADN	PRI	11-ABR-2001
DEFINICIÓN	Cadena H de Ig humana de germline gamma-2 Extremo 3'.		Región: G-E-A	B: Región constante
N.º ACCESO	J00230 V00554			
VERSIÓN	J00230.1 GI:184750			
PALABRAS CLAVE	-			
ORGANISMO	humano			
FUENTE	Homo sapiens			
	Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos;			
	Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.			
REFERENCIA	1 (bases 1 a 2009)			
AUTORES	Ellison.J. y Hood. L.			
TÍTULO	Linkage and sequence homology of two human immunoglobulin gamma heavy chain constant region genes			
REVISTA	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 (6), 1984-1988 (1982)			
MEDLINE	82197621			
PUBMED	6804948			
REFERENCIA	2 (bases 896 a 1256; 1749 a 1937)			
AUTORES	Krawinkel, H. y Rabbitts.T. H.			
TÍTULO	Comparison of the hinge-coding segments in human immunoglobulin gamma heavy chain genes and the linkage of the gamma 2 and gamma 4			

FIGURA 7K

MEDLINE	subclass genes JOURNAL EMBO J. 1 (4), 403-407 (1982)		
REFERENCIA	84235992 PUBMED 6329676		
AUTORES	3 (bases 475 a 1071; 1179 a 1330; 1461 a 1524)		
TÍTULO	Takahashi, N. , Ueda, S. , Obata, M. , Nikaido, T. , Nakai, S. y Honjo, T. Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of a gene family JOURNAL Cell 29 (2), 671-679 (1982)		
MEDLINE	83001943 PUBMED 6811139		
COMENTARIO	El 2 Marzo de 2000 esta versión sustituye: 32759 (2) informa también secuencias de gamma-3, gamma-4 y un pseudogén gamma. La mayoría de esta secuencia es homóloga en un 95% con gamma-4. Los exones de la bisagra son homólogos solo en un 70%. Los autores estiman que gamma-2 y gamma-4 se separaron hace 6,6 millones de años. Los autores de (1) creen que la transferencia mediada por dominio de intrones ha desempeñado un papel importante en la evolución de los genes humanos gamma. Asimismo, informan de las regiones bisagra de gamma-1, gamma-3, gamma-4 y un pseudogén de gamma. (1) se estima que la divergencia entre los genes humanos gamma se produjo entre 7,7 y 4,4 millones de años. Esta entrada es parte de una región multigénica que incluye los genes gamma-2, gamma-4, épsilon-1 y alfa-2. La ubicación relativa de los cuatro genes la determinaron Flanagan y Rabbitts (Nature 300. 709-713 (1982)). Se refieren a este grupo de genes como región B. Los genes de la región A son gamma-3, gamma-1, pseudo-épsilon y alfa-1. Flanagan y Rabbitts también determinaron las ubicaciones generales de las dos regiones. Situaron la región A entre las regiones JH/mu/delta y la región B. Fuente de información completa: ADN de hígado fetal humano, biblioteca de T. Maniatis (3) y Lawn et al. (2), (1); clones p-gamma-2RPA3 (2), 5A (3) e Ig-gamma-2-15 (1).		
CARACTERÍSTICA	Situación/Calificadores	fuelle	1..2009
CAS	/organismo = "Homo sapiens"		
	/db_xref = "taxón: 9606"		/mapa = "14q32.33"
	/germline	intrón	<1..215
	/gen = "IgH"	gen	<1..2009
	/gen = "IgH"		/nota = "IGHG2"
exón	216..509	/gen = "IgH"	
	/nota = "G00-119 -338"	Región_C	216..508
	/gen = "IgH"		
SDC	/nota = "región constante de cadena pesada CH1 de inmunoglobulina" unión (<216..509, 902..937, 1056..1382, 1480..1802) /gen = "IgH" /comienzo_codón = 3 /producto = "cadena pesada de inmunoglobulina gamma-2" /nº_proteína = "AAB59393.1" /db_xref = "GI: 184758" /translation="STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVDFYFPEPVTVSWSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCC VECPFCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLHISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML DSDCGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPQK"		
intrón	510..901	/gen = "IgH"	
conflicto	537	/gen = "IgH"	
	/cita = (3)	/sustituir = " "	
conflicto	550..551	/gen = "IgH"	
	/cita = (3)	/sustituir = " "	
conflicto	570	/gen = "IgH"	
	/cita = (3)	/sustituir = " "	
conflicto	777..778	/gen = "IgH"	
	/cita = (3)	/sustituir = " "	
conflicto	791	/gen = "IgH"	
	/cita = (3)	/sustituir = " "	
conflicto	864	/gen = "IgH"	
	/cita = (3)	/sustituir = " "	
región_C	901..936	/gen = "IgH"	
	/nota = "bisagra de cadena pesada de inmunoglobulina"		
exón	902..937	/gen = "IgH"	
	/nota = "G00-119 -338"	intrón	938..1055
	/gen = "IgH"	región_C 1055.1381	

FIGURA 7L

exón	/gen = "IgH"				
	/nota = "región constante de cadena pesada CH2 de inmunoglobulina"				
	1056..1382	/gen = "IgH"			
	/nota = "G00-119 -338"	intrón	1383..1479		
exón	/gen = "IgH"	región_C 1479..1799			
	/gen = "IgH"				
	/nota = "región constante de cadena pesada CH3 de inmunoglobulina"				
	1480..1802	/gen = "IgH"			
	/nota = "G00-119 -338"	conflicto	1493		
	/gen = "IgH"	/cita = (3)			
	/sustituir = ""	conflicto 1802..1806			
	/gen = "IgH"	/cita = (2)			
	/sustituir = ""	conflicto 1814..1815			
	/gen = "IgH"	/cita = (2)			
	/sustituir = ""	conflicto 1825			
	/gen = "IgH"	/cita = (2)			
	/sustituir = ""	conflicto 1890			
	/gen = "IgH"	/cita = (2)			
	/sustituir = ""	señal poliA 1903..1908			
	/gen = "IgH"	conflicto 1909..1918			
	/gen = "IgH"	/cita = (3)			
/sustituir = ""	conflicto 1929..1932				
/gen = "IgH"	/cita = (2)				
/sustituir = " "	CONTADOR BASE 410 a 700 c 568 g 331 t				
ORIGEN					

ORIGEN

```

1 agctttcttgg ggcgagccgg .gcctgaactt ggcttttgggg caggggagtgg gctaagggtga
61 ggcagggtggc gccagccagg tgcacaccca atgcccgtga gccagagcac tggaccctgc
121 ctggacccttc gtggatagac aagaaccgag gggcctctgc gccggggccc agctctgttc
181 cacaccgagg tccataggca ccacctctct tgcagccttc accaaggggc catcggtctt
241 cccctggggc cctgcttcca ggagcacttc cgagagcaca gctgcccctgg gctgcccctgg
301 caaggactac tccccgaac cgggtgactgg gtctgggaac tcaggcgttc tgaccagcgg
361 cgtgacaccc tccccagctg tcttacagtc ctacaggactc tactccccca gcagcgtggg
421 gaccgtgccc tccagcaact tgggaaccca gacctacacc tgcacagctag atcacaagcc
481 cagcaaacacc aagggtggaca agacagttgg tgagaggcca gctcaggggg ggagggtgct
541 tgcctggaagc cagggttcagc cctcctgccc ggacgcaccc cggctgctga gccccagccc
601 agggcagcaa ggcaggcccc atctgtcttc tcaaccggag gctcctgccc gcccactcca
661 tgcctcaggga gagggtcttc tggctttctc caccaggctc caggcaggga cagggtgggt
721 gccccttacc caggccttcc acacacaggg gcagggtgctt ggctcagacc tgcacaagac
781 catatccggg aggaacctgc cctgaccta agccgacccc aaaggccaaa ctgtccactc
841 cctcagctcg gacaccttct ctctctccag atccgagtaa ctcccaactt tctctctgca
901 gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccc tggcccaggta agccagccca ggctctgccc
961 tccagctcaa ggcgggacag gtgcccctaga gtacccctga tccagggaca ggcccagctt
1021 ggggtgctgac acgttccactt ccactctctt ctcagcacca cctgtggcag gaccgtcagt
1081 ctctctcttc ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgacc tcccggaacc ctgaggtcac
1141 gtgctggttg gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga
1201 cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gaggcagttc acagcacgtt
1261 cgtgtggttc agcgtctctc ccgtgtgtga ccaggactgg ctgaacggga aggagtaaaa
1321 gtgcaagggtc tccaacaaag gctctccagc ccccatcgag aaaaacctct ccaaaaacca
1381 aggtggggacc cgcgggggtat gaggggccca tggacagagg ccggctcggc ccacctcttg
1441 cctcgggagt gaccgtctgt ccaacctctg tccctacagg gcagccccga gaacctacag
1501 tgtacacactt gcccctctcc cgggaggaga tgaccaagaa ctaggtcagc ctgacctgct
1561 tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg cgtggagtgt ggagagcaat gggcagccgg
1621 agaacaaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctccttc tctctctaca
1681 gcaagctcac cgtggacaaag agcaggtggc agcaggggaa cgtctctctc tgcctcgtga
1741 tgcattgaggc tctgcacaa cactacacgc agaagagcct ctccctgctc cgggtaaat
1801 agtgccacag gccggcaagc ccccgctccc caggctctct gggctcggctg aggatgcttg
1861 gcaagctaccc cgtgtacata ctctccaggg acccagcatg gaaataaagc acccagcgtc
1921 gcccctggggc cctgcgagac tgtgatgggt ctctccgtgg gtcaggccga gctcggggcc
1981 tgagtgggcat gaggggaggc aggtgggttc

```

[SEC ID N.º: 55]

FIGURA 7M

V. REGIÓN C DE LA IG GAMMA-3 HUMANA - HOMO SAPIENS (HUMANO)

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

CAA27268 C gamma 3 (Homo sapiens)

10	20	30	40	50	60
ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
70	80	90	100	110	120
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YTCNVNHKPS	NTKVDRVEL	KTPLGDTTHT	CPRCPEPKSC
130	140	150	160	170	180
DTPPPCPRCP	EPKSCDTPPP	CPRCPEPKSC	DTPPPCPRCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT
190	200	210	220	230	240
LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVQFKWYVD	GVEVHNAKTK	FREEQYNSTF	RVVSVLTIVLH
250	260	270	280	290	300
QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK
310	320	330	340	350	360
GFYPSDIAVE	WESSGQPENN	YNTTTPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NIFSCSVME
370	377				
ALHNRFTOKS	LSLSPGK				

[SEC ID N.º: 24]

FIGURA 7N

SECUENCIA DE CODIFICACIÓN

```

GCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG
GGCTGCGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCCGTG
CACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC
TTGGGCAACCCAGACCTACACCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCTC
AAAACCCCACTTGGTGACACAACCTCACACATGCCCCAGGTGCCCAGAGCCCAATCTTGTGACACACCTCCCCCG
TGCCACCGGTGCCAGAGCCCAATCTTGTGACACACCTCCCCATGCCACGGTGCCCAGAGCCCAATCTTGT
GACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGCCAGCACCTGAACTCTTGGGAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA
AAACCAAGGATACCTTATGATTTCCTCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCCGAGGTCCAGTTCAAGTGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAAGCTCTCAGGTCCTGACCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGACAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCTTCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCCTGACCTGCTGGTCAAA
GGCTTCTACCCCAAGCATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAGCGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAACACACGCTT
CCCATGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACATCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACACCCTTCACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
GGTAAATGA

```

[SEC ID N.º: 23]

GenBank

X03604 gen gamma-3 de IgG humana IgG G3m (b) Región constante de cadena pesada de EZZ (individual II-4 de TOU) PubMed, Proteína, Secuencias Relacionadas, Taxonomía, OMIM, LinkOut

LOCUS HSIIGC3 2590 bp ADN PRI 24-NOV-1998

DEFINICIÓN Gen gamma-3 de IgG humana IgG G3m (b) Región constante de cadena pesada de EZZ (individual II-4 de TOU).

N.º ACCESO X03604 M12958

VERSIÓN X03604.1 GI:33070

PALABRAS CLAVE Región constante; gamma-inmunoglobulina; cadena pesada de Ig; inmunoglobulina.

ORGANISMO humano

FUENTE Homo sapiens

Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos; Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.

REFERENCIA 1 (bases 1 a 2590)

AUTORES Huck, S., Fort, P., Crawford, D.H., Lefranc, M.P. and Lefranc, G.

TÍTULO Sequence of a human immunoglobulin gamma 3 heavy chain constant region gene: comparison with the other human C gamma genes

REVISTA Nucleic Acids Res. 14 (4), 1779-1789 (1986)

MEDLINE 86148507

REFERENCIA 2 (bases 4 a 204; 2202 a 2236)

AUTORES Takahashi, N., Ueda, S., Obata, M., Nikaido, T., Nakai, S. y Honjo, T.

TÍTULO Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of a gene family

REVISTA Cell 29 (2), 671-679 (1982)

MEDLINE 83001943

CARACTERÍSTICAS

fuelle

Situación/Calificadores

1..2590

/organismo = "Homo sapiens"

/db_xref = "taxón: 9606"

conflicto

28

/nota = "falta T en (2)".

/cita = (2)

conflicto

80..82

/nota = "CGC es GCG en (2)"

FIGURA 70

conflicto	/cita = (2) 120 /nota = "C es T en (2)"
conflicto	/cita = (2) 135 /nota = "T es C en (2)".
SCD	/cita = (2) unión (<215..509, 901..951, 1095..1239, 1283..1327, 1471..1515, 1634..1963, 2061..>2380) /comienzo_codón = 1 /producto = "C gamma 3" /nº_proteína = "CAA27268.1" /db_xref = "GI: 577056"
<pre> /translation="ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKT PLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESGQPENNYNTTPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHLEHNRFTQKSLSLSPGK" </pre>	
intrón	510..900 /nota = "intrón I"
intrón	952..1094 /nota = "intrón II"
intrón	1140..1282 /nota = "intrón III"
intrón	1328..1470 /nota = "intrón IV"
intrón	1516..1633 /nota = "intrón V"
intrón	1964..2060 /nota = "intrón VI"
característica_misc	2484..2489 /nota = "pot. señal poliA"
CONTADOR BASE	541 a 925 c 703 g 421 t
ORIGEN	
<pre> 1 agctttcttg ggcaggccag gcctgacttt ggctgggggc agggaggggg ctaaggtgac 61 gcagggtggc ccagccaggc gcacacccaa tgcccgtgag cccagacact ggacctgac 121 tggacctctg tggatagaca agaaccgagg ggccctctgc cccaggggcc agctctgtcc 181 cacaccgcag tcacatggcg ccacctctct tgcagcttcc accaaggggc cctcgtctcc 241 cccctctggc cctgctcca ggagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgctggg 301 caaggactac ttccccgaac cggtagcggg gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg 361 cgtgcacacc ttcccggtg tccacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggg 421 gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacacc tgcaacgtga atcacaagcc 481 cagcaacacc aagggtggaca agagaggtgg tgagaggcca gcgcaggggg ggagggtgtc 541 tgctgggaag caggctcagc cctcctgctc ggacgcaccc cggctgtgca gtcccagccc 601 aggggcagcaa ggcaggcccc gtctgactcc tcaccgggag cctctgcccg cccactcat 661 gctcaggggg aggggtctct ggcttttccc accaggctcc gggcaggcac aggtggatg 721 cccctacccc aggcccttca cacacagggg cagggtgctg gctcagagct gccaaaagcc 781 atatccagga ggacctgcc cctgacctaa gccacccca agggccaaac tctctactca 841 ctcagctcag acaccttctc tcttcccaga tctgagtaac tcccaatctt ctctctgcag 901 agctcaaaac cccacttggg gacacaactc acacatgccc acgggtgccc ggtaagccag 961 cccaggactc gccctccagc tcaaggcggg acaagagccc tagagtggcc tgagtccagg </pre>	

FIGURA 7P

```

1021 gacaggcccc agcagggtgc tgacgcatcc acctccatcc cagatccccc taactcccaa
1081 tcttctctct gcagagcccc aatcttgtga cacacctccc ccgtgcccac ggtgcccagg
1141 taagccagcc caggcctcac cctccagctc aaggcaggac aagagcccta gagtggcctg
1201 agtccagggg caggccccag cagggtgctg acgcgtccac ctccatcccc gatccccgta
1261 actcccaatc ttctctctgc agagcccaaa tcttgtgaca cacctcccc. atgccacgg
1321 tgcccaggta agccagcccc ggcttcgccc tccagctcaa ggcgggataa gagccctaga
1381 gtggcctgag tccagggaca ggcgccagca ggggtgctgac gcatccacct ccatcccaga
1441 tccccgtaac tcccaatctt ctctctgcag agcccaaatc ttgtgacaca cctccccgt
1501 gcccagggtg cccaggtaag ccagcccagg cctcgccctc cagctcaagg caggacagg
1561 gccctagagt ggcttgcac cagggacagg tcccagtcgg gtgctgacac atctgcctcc
1621 atctcttctt cagcacctga actcctggga ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa
1681 cccaaggata cctttatgat ttcccggacc cctgaggta cgtgctgggt ggtggacgtg
1741 agccacgaag accccagggt ccagttcaag tggtaagtg acggcgtaga ggtgcataat
1801 gccaaagacaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt tccgtgtggg cagcgtcctc
1861 accgtcctgc actaggactg gctgaacggc aaggagtaga agtgcaagggt ctccaacaaa
1921 gccctccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggtgggac ccgcggggta
1981 tgaggggccac atggacagag gccagcttga cccacctct gccctgggag tgaccgctgt
2041 gccaacctct gtccctacag gacagccctc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc
2101 ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaa gcttctacce
2161 cagcgacatc gccgtggagt gggagagcag cgggcagccg gagaacaact acaacaccac
2221 gcctcccatg ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa
2281 gagcagggtg cagcagggga acatcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa
2341 ccgcttcacg cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaaa tgagtgcgac agctggcaag
2401 cccccgctcc ccgggtcttc ggggtcgcgc gaggatgctt ggcaagtagc ccgtgtacat
2461 acttccccgg caaccagcat ggaaataaag caccagcgc tgccctgggc cctgtgaga
2521 ctgtgatggt tcttccacg ggtcaggccg agtctgaggc ctgagtgaac tgaggaggc
2581 agagcgggtc

```

[SEC ID N.º: 56]

VI. REGIÓN C DE LA IG GAMMA-4 HUMANA - HOMO SAPIENS (HUMANO)

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

>sp |P01861| GC4_REGIÓN C DE LA IG GAMMA-4 HUMANA – Homo sapiens (Humano).

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTPPAVLQSS

      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGQPSV

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIETKISKAK GQPREPQVYT LPDSQEEMTK

      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG

```

FIGURA 7Q

310 320 327
 NVFSCSVME ALNHYTQKS LSLSLGK

[SEC ID N.º: 26]

SECUENCIA DE CODIFICACIÓN

						g	-1
cttccaccaa	gggccatcc	gtctccccc	tggcgccctg	ctccaggagc	acctccgaga		60
gcacagccgc	cctgggctgc	ctggccaagg	actactccc	cgaaaccggtg	acggcgctcgt		120
ggaaactcagg	cgccctgacc	agcggcgctgc	acacctccc	ggctgtccca	cagtcctcag		180
gactctactc	cctcagcagc	gtggcgaccg	tgcctccag	cagcttgggc	acgaagacct		240
acacctgcaa	cgtagatcac	aagcccagca	acaccaagg	ggacaagaga	gttgagtcca		300
aatatggctc	cccatgccca	tcatgccag	cacctgagt	cctgggggga	ccatcagctc		360
tcctgtccc	cccaaaaccc	aaggacactc	tcatgatctc	ccggaccctc	gaggtcacgt		420
gcgtgggtgg	ggacgtgagc	caggaaagacc	ccgaggcca	gttcaactgg	tacgtggatg		480
gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcgaggga	gcagtccaac	agcacgtacc		540
gtgtgggtcag	cgctctcacc	gtctctgacc	aggactggct	gaacggcaag	gagtacaagt		600
gcaagggtctc	caacaaaggc	ctcccgctct	ccatcgagaa	aacctctcc	aaagccaaag		660
ggcagccccc	agagccacag	gtgtacaccc	tgcctccatc	ccaggaggag	atgaccanga		720
acctgggtcag	cctgacctgc	ctggccaag	gctctaccc	cagcgacatc	gccgtggagt		780
gggagagcaa	tgggcagccg	gagaaacaact	acaagaccac	gctccctcgtg	ctggactccg		840
acggctccct	ctctctctac	agcaggctaa	ccgtggacaa	gagcaggctgg	caggagggga		900
atgtctctctc	acgtccctg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacaca	cagaagagcc		960
ctccctcgtc	tctgggtaaa	tga					983

[SEC ID N.º: 25]

GenBank

K01316	Ig humana de germline
LOCUS	HUMIGCD2 2028 bp ADN PRI 11-ABR-2001
DEFINICIÓN	Cadena H de Ig humana de germline Región: G-E-A B: Región constante gamma-4, Extremo 3'
N.º ACCESO	K01316
VERSIÓN	K01316.1 GI: 184751
PALABRAS CLAVE	.
FUENTE	humano
ORGANISMO	Homo sapiens
REFERENCIA	Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos; Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.
AUTORES	1 (bases 1 a 2028)
TÍTULO	Ellison, J., Buxbaum, J. y Hood, L.
REVISTA	Nucleotide sequence of a human immunoglobulin C gamma 4 gene
MEDLINE	DNA 1 (1), 11-18 (1981)
REFERENCIA	83157104
AUTORES	2 (bases 475 a 1069; 1180 a 1331, 1432 a 1655)
TÍTULO	Takahashi, N., Ueda, S., Obata, M., Nikaido, T., Nakai, S. y Honjo, T.
REVISTA	Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of a gene family
MEDLINE	Cell 29 (2), 671-679 (1982)
PUBMED	83001943
REFERENCIA	6811139
AUTORES	3 (bases 894 a 1106)
TÍTULO	Krawinkel, U. y Rabbitts, T. H.
REVISTA	Comparison of the hinge-coding segments in human immunoglobulin gamma heavy chain genes and the linkage of the gamma 2 and gamma 4 subclass genes
MEDLINE	EMBO J. 1 (4), 403-407 (1982)
PUBMED	84235992
REFERENCIA	6329676
AUTORES	4 (bases 1 a 2028)
TÍTULO	Ellison, J. y Hood, L.
REVISTA	Linkage and sequence homology of two human immunoglobulin gamma heavy chain constant region genes
MEDLINE	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 (6), 1984-1988 (1982)
PUBMED	82197621
	6804948

FIGURA 7R

COMENTARIO

(1) informa de que el gen C-gamma-4 humano es homólogo con los genes gamma-1, gamma-2a y gamma-2b de murino (sobre el 75%). (3) también indica secuencias parciales para los pseudogenes gamma-2, gamma-3 y gamma. (2) muestra las regiones bisagra del gamma-1, gamma-2, gamma-3, y pseudo-gamma.

Esta entrada es parte de una región multigénica (región B), que incluye los genes gamma-2, gamma-4, épsilon-1 y alfa-2. Véase segmento 1 para más comentarios.

Fuente de información completa:

ADN de hígado fetal humano, biblioteca de T. Maniatis (3) y Lawn et al. (1), (2); clones 24B (1), lambda-HG4.1 (3) e Ig-gamma-4-2 (2).

CARACTERÍSTICAS
fuente

Situación/Calificadores

1..2028

/organismo = "Homo sapiens"

/db_xref = "taxón: 9606"

/mapa = "14q32.33"

/germline

gen

<1..2028

/gen = "IgH"

/nota = "IGHG4"

intrón

<1..215

/gen = "IgH"

/nota = "gamma-4 intrón J-C"

SCD

unión (<216..509, 900..935, 1054.. 1383, 1481..1803)

/gen = "IgH"

/comienzo_codón = 3

/producto = "cadena pesada de inmunoglobulina gamma-4"

/nº_proteína = "AAB59394.1"

/db_xref = "GI: 184759"

/translation="STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPSPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAXTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCRVSNKGLPSSIEKTI SKA
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LSDGCSFFLYSRLLTVDKSRHQQEGNVFPCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK"

exón

216..509

/gen = "IgH"

/nota = "G00-119-340"

intrón

510..899

/gen = "IgH"

exón

900..935

/gen = "IgH"

intrón

536..1053

/gen = "IgH"

exón

1054..1383

/gen = "IgH"

intrón

1384..1480

/gen = "IgH"

exón

1481..1803

/gen = "IgH"

CONTADOR BASE
ORIGEN

421 a

709 c

567 g

331 t

```

1 agcttctctg ggcaggccgg gcttgacttt ggctgggggg agggaggggg ctaaggctgac
61 gcaggctggcg ccagccaggc gcacacccaa tgcccatgag cccagacact ggaccctgca
121 tggaccatcg cggatagaca agaaccgagg ggctctctgc ccttggggcc agctctgtcc
181 cacaccgagg tcacatggca ccacctctct tgcagcttcc accaaggggc catccgtctt
241 ccccttggcg ccttgcctcca ggaacacctc cgagagcaca gctgcccctg gctgcttggc
301 caaggactac ttccctgaac cggcgacggc gtcgtgggac tcaggcgccc tgaccagcgg
361 cgtgcacacc ttcccggtcg tcttacagtc cttaggacct tactccctca gcagcgtggc
421 gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc tgcaacgtag atcacaaagg
481 cagcaacacc aaggctggaa agagagcttg tgagaggcca gcacaggagg ggaagggtgtc
541 tgcctggaagc caggctcagc cctcttgcct ggacgcaccc cggctgtgca gcccagacct
601 agggcagcaa ggcctgcccc atctgtcttc tcacccggag gctcttgacc acccactca
661 tgcctcaggga gagggtcttc tggattcttc caccaggctc ccggcaccac aggcctggatg
721 cccctacccc aggccttgcg catacaggc aggtgctgcg cttagacctg ccaagagcca
781 catccgggag gaccttgcct ctgacctaaag cccaccccaa aggccaaact ctcnctccc

```

FIGURA 7S

```

841 tcagctcaga caccctctct cctcccagat ctgagtaact cccaatcttc tctctgcaga
901 gtccaaatat ggtcccccac gcccatcatg cccaggtaag ccaacccagg cctcgccttc
961 cagctcaagg cgggacaggt ggcctagagt agcctgcata cagggacagg ccccagccgg
1021 gtgctgacgc atccacctcc atctcttctt cagcacctga gttcctgggg ggaccatcag
1081 tcttccctgt cccccaaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctcccggaac cctgaggtca
1141 cgtgcgtggg ggtggacgtg agccaggaaag accccgaggt ccagtccaac tggtagctgg
1201 atggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagttc aacagcacgt
1261 accgtgtggg cagcgtcttc accgtcctgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca
1321 agtgcgaagg ctccaacaaa ggctctccgt cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca
1381 aaggtgggac ccacgggggt cgagggccac acggacagag gccagctcgg cccacccctc
1441 gccctgggag tgaccgtgtg gccaacctct gtcctacag ggacgccccg agagccacag
1501 gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc
1561 ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg
1621 gagaacaact acaagaccac gctctccgtg ctggactccg acggctcctt ctctctctac
1681 agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtg caggagggga atgtcttctc atgtccctg
1741 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa
1801 tgagtggcag ggccggcaag ccccgcctcc cgggctctc ggggtcgcgc gaggatgctt
1861 ggcacgtacc ccgtctacat acctcccaag caccagcat ggaataaag caccaccac
1921 tgccctgggc ccctgtgaga ctgtgatggg tcttccacg ggtcaggccg agtctgaggc
1981 ctgagtgaac tgagggaggc agagcgggtc ccactgtccc cacactgg

```

[SEC ID N.º: 57]

VII. REGIÓN C DE LA IG DELTA HUMANA - HOMO SAPIENS (HUMANO)

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

>sp |P01880| DTC_REGIÓN C DE LA IG DELTA HUMANA – Homo sapiens (Humano)

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
APTKAPDVFP IISGCRHPKD NSPVVLACLI TGYHPTSVTV TWYMGTSQSP QRTFPEIQRR

      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
DSYYMTSSQL STPLQWRQG EYKCVVQHTA SKSKKEIFRW PESPKAQASS VPTAQPPAEG

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
SLAKATTAPA TTRNTGRGGE EKKKEKEKEE QEERETKTPE CPSHTQPLGV YLLTPAVQDL

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
WLRDKATFTC FVVGSDLIKDA HLTWEVAGKV PTGGVEEGLL ERHSNGSQSQ HSRLTLPRSL

      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
WNAGTSVTCT LNHPSLPPQR LMALEPAAQ APVKLSLNL LASSDPPEAAS WLLCEVSGFS

      310     320     330     340     350     360
      |      |      |      |      |      |
PPNILLMWLE DQREVNTSGF APARPPPQPG STTFWAWSVL RVPAPSPQFP ATYTCVVSHE

```

FIGURA 7T

370 380
 | |
 DSRTLLNASR SLEVSIVTDH GPM

[SEC ID N.º: 28]

GenBank

K02876 IgD humana de germline... (gi: 184766) PubMed, Proteína, Secuencias Relacionadas, Taxonomía, OMIM, LinkOut
 LOCUS HUMIGCD2 300 bp ADN PRI 08-NOV-1994
 DEFINICIÓN Gen de la cadena de IdG humana de germline, región C, región bisagra primera.
 N.º ACCESO K02876
 VERSIÓN K02876.1 GI: 184766
 PALABRAS CLAVE Región C; germline; exón bisagra; cadena pesada de inmunoglobulina; inmunoglobulina delta.
 FUENTE ADN de Homo sapiens (paciente individual aislado con leucemia linfocítica crónica (LLC)).
 ORGANISMO Homo sapiens
 Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos; Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.
 REFERENCIA 1 (bases 1 a 300)
 AUTORES White, M.B., Shen, A.L., Word, C.J., Tucker, P.W. y Blattner, F.R.
 TÍTULO Human immunoglobulin D: genomic sequence of the delta heavy chain
 REVISTA Science 228 (4700), 733-737 (1985)
 MEDLINE 85192522
 COMENTARIO Véase segmento 1
 CARACTERÍSTICAS
 fuente Situación/Calificadores
 1..300
 /organismo= "Homo sapiens"
 /aislamiento= "Paciente con leucemia linfocítica crónica (LLC)"
 /db_xref= "taxón: 9606"
 /mapa="14q32.33"
 /tipo_célula= "linfocito"
 /germline
 intrón <1..151
 /gen = "IGHD"
 /nota = "G00-120-084"
 /número = 1
 exón 101..202
 /parcial
 /gen = "IGHD"
 /nota = "región bisagra-1; G00-120 -084"
 /número = 2
 intrón 203..>300
 /gen = "IGHD"
 /nota = "G00-120-084"
 /número = 2
 gen unión (K02875.1:1..495, 1..300, K02877.1: 1..300, K02878.1:1..500, K02879.1:1..500, K02880.1:1..100, K02881.1:1..200, K02882.1:1..52)
 /gen = "IGHD"
 SCD unión (K02875.1:101..403, 101..202, K02877.1:101..172, K02878.1:101..424, K02879.1:101..424, K02881.1:25..182, K02882.1:44..52)
 /parcial
 /gen = "IGHD"
 /nota = "enlace de membrana"
 /comienzo_codón= 3
 /producto = "cadena delta de inmunoglobulina"
 /n.º_proteína = "AAA52771.1"
 /db_xref = "GI: 495872"
 /db_xref = "GDB G00-120 -084"
 /translation= "PTKAPDVFPILSGCRHPKDNSPVVLACILITGYHPTSVTVTWYMG
 TQSQPORTFPEIQRRDSYNTSSQLSTPLOCHWROGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPEP
 PKAQASSVPTAQPOAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEERETKTPEC"

FIGURA 7U

PSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGL
 LERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSL
 NLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPRSTTFW
 ANSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYLAMTFLIPQSKDENSDD
 YTTFDVGSGLWTTTLSTFVALFILTLXSGIVTFIKVK*

[SEC ID N.º: 28]

SCD unión (K02875.1:101..403, 101..202, K02877.1:101..172, K02878.1:101..424,
 K02879.1:101..424, K02880.1:25..53)

/parcial

/gen = "IGHD"

/nota = "forma secretada"

/comienzo_codón = 3

/producto = "cadena delta de inmunoglobulina"

/n.º_proteína = "AAA52770.1"

/db_xref = "GI: 495871"

/db_xref = "GDB G00-120 -084"

/translation = "PTKAPDVFPPIISGCRHPKDNSPVVLACLITGYHPTSVTVWYMG

TQSQPQRTFPEIQRDSYNTSSQLSTPQQWRQGEYKCVVOHTASKSKKEIFRWPEP

PKAQASSVPTAQPOAEGSLAKATTAPATTNTGRGGEKKEKEKEEQEERETKTPEC

PSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGL

LERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSL

NLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPRSTTFW

ANSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYLTDHGPVK*

CONTADOR BASE 59 a 133 c 52 g 56 t

ORIGEN sobre 300 bp tras el segmento; 118 bp aguas arriba del sitio Stul.

```

1 taggcctgctt gtgcccccca cctgcctgtc cacaacccag cctctggtac atccatgccc
61 tctgccttaa gcttcacctg cacttttctt tggatttcag agtctccaaa ggcacaggcc
121 tcttcctgtt ccactgcata accccaagca gagggtagcc tcgccaaggc aaccacagcc
181 ccagccacca ccgtaacac aggtgagaag ccccttctct gcacactcca ccccaacca
241 cctgctcatt cctcagctgc cctctccagg cagccctcca caactcctt tctgagctc

```

[SEC ID N.º: 27]

K02877 Ig humana de germline...[gi: 184767] PubMed, Proteína, Secuencias Relacionadas, Taxonomía, OMIM, LinkOut

LOCUS HUMIGCH03 300 bp ADN PRI 08-NOV-1994

DEFINICIÓN Gen de la región C de la cadena de Ig delta-H de germline humana, segunda región bisagra (linfocito LLC).

N.º ACCESO K02877

VERSIÓN K02877.1 GI: 184767

PALABRAS CLAVE Región C; germline; exón bisagra; cadena pesada de inmunoglobulina; inmunoglobulina delta.

ORGANISMO FUENTE ADN de Homo sapiens (paciente individual aislado con leucemia linfocítica crónica [LLC]).

ORGANISMO Homo sapiens

Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos; Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.

REFERENCIA 1 (bases 1 a 300)

AUTORES White, M.B., Shen, A.L., Word, C.J., Tucker, P.W. y Blattner, F.R.

TÍTULO Human immunoglobulin D: genomic sequence of the delta heavy chain

REVISTA Science 228 (4700), 733-737 (1985)

MEDLINE 85192522

COMENTARIO Véase segmento 1

CARACTERÍSTICAS Situación/Calificadores

fuelle 1..300

/organismo = "Homo sapiens"

/aislamiento = "Paciente con leucemia linfocítica crónica (LLC)"

/db_xref = "taxón: 9606"

/mapa = "14q32.33"

/tipo_célula = "linfocito"

/germline

intrón <1..100

/gen = "IGHD"

/nota = "G00-120-084"

/número = 2

exón 101..172

/gen = "IGHD"

/nota = "región bisagra-2; G00-120 -084; putativo"

/número = 3

FIGURA 7V

intrón	103..>300 /gen = "IGHD" /nota = "G00-120-084" /número = 3
gen	unión (K02875.1:1..495, K02876.1:1..300, 1..300, K02878.1:1..500, K02879.1:1..500, K02880.1:1..100, K02881.1:1..200, K02882.1:1..52) /gen = "IGHD"
SCD	unión (K02875.1:101..403, K02876.1:101..202, 101..172, K02878.1:101..424, K02879.1:101..424, K02881.1:25..182, K02882.1:44..52) /parcial /gen = "IGHD" /nota = "enlace de membrana" /comienzo_codón = 3 /producto = "cadena delta de inmunoglobulina" /nº_proteína = "AAA52771.1" /db_xref = "GI: 495872" /db_xref = "GDB G00-120 -084" /translation="PTKAPDVFPILSGCRHPKDNSPVVLACLI TGYHPTSVTVTWYMG TQSQPQRTFPEIQRRDSYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE PKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEQEERETKTPEC PSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGL LERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSL NLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPRSTTFW AWSVLRVPAAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLNASRSLEVSYLAMTPLIPQSKDENSDD YTFDDVGSLLWTTLSFVALFILTLTLLYSQIVTFIKVK"
SCD	unión (K02875.1:101..403, K02876.1:101..202, 101..172, K02878.1:101..424, K02879.1:101..424, K02880.1:25..53) /parcial /gen = "IGHD" /nota = "forma secretada" /comienzo_codón = 3 /producto = "cadena delta de inmunoglobulina" /nº_proteína = "AAA52770.1" /db_xref = "GI: 495871" /db_xref = "GDB G00-120 -084" /translation="PTKAPDVFPILSGCRHPKDNSPVVLACLI TGYHPTSVTVTWYMG TQSQPQRTFPEIQRRDSYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE PKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEQEERETKTPEC PSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGL LERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSL NLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPRSTTFW AWSVLRVPAAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLNASRSLEVSYVTDHGPMK"
CONTADOR BASE	102 a 52 c 70 g 76 t
ORIGEN	Sobre 1,85 kb tras segmento 2.
<pre> 1 gtcattagct ggatttagcc attccacaat gtacacatat ttcaaacatt gtgttgata 61 tgataaacat gtataatttc tgtcaactaa aaatttttag gaagaggagg agaagagaag 121 aagaaggaga aggagaaaga ggaacaagaa gagagagaga caaagacacc aggttttttc 181 tgacccctgg gctatcaaaa cacctattgc ccaataacta gttggccgtt ggtgccctaa 241 actattgaag cgattgctgt tatgtggatg ggccccggac acttagaaac tcgtgacccc </pre>	

[SEC ID N.º: 29]

FIGURA 7W

K02878 IgD humana de germline... [gi: 184768] PubMed, Proteína, Secuencias Relacionadas, Taxonomía, OMIM, LinkOut

LOCUS	HUMIGCH04	500 bp	ADN	PRI	08-NOV-1994
DEFINICIÓN	Genes de la cadena de IgD de Germline humana, Región C, Dominio C delta-2				
N.º ACCESO	K02878				
VERSIÓN	K02878.1 GI: 184768				
PALABRAS CLAVE	Región C; germline, cadena pesada de inmunoglobulina; cadena delta de inmunoglobulina.				
FUENTE	ADN de Homo sapiens (paciente individual aislado con leucemia linfocítica crónica [LLC])				
ORGANISMO	Homo sapiens Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos; Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.				
REFERENCIA	1 (bases 1 a 500)				
AUTORES	White, M.B., Shen, A.L., Word, C.J., Tucker, P.W. y Blattner, F.R.				
TÍTULO	Human immunoglobulin D: genomic sequence of the delta heavy chain				
REVISTA	Science 228 (4700), 733-737 (1985)				
MEDLINE	85192522				
COMENTARIO	Véase segmento 1.				
CARACTERÍSTICAS	Situación/Calificadores				
fuerce	1..500				
	/organismo = "Homo sapiens"				
	/aislamiento = "Paciente con leucemia linfocítica crónica (LLC)"				
	/db_xref = "taxón: 9606"				
	/mapa = "14q32.33"				
	/tipo_célula = "linfocito"				
	/germline				
intrón	<1..100				
	/gen = "IGHD"				
	/nota = "G00-120-084"				
	/número = 3				
exón	101..424				
	/gen = "IGHD"				
	/nota = "dominio constante delta-2; G00-120 -084"				
	/número = 4				
intrón	425..>500				
	/gen = "IGHD"				
	/nota = "G00-120-084"				
	/número = 4				
intrón	425..>500				
	/gen = "IGHD"				
	/nota = "IgD-s intrón D"				
gen	unión (K02875.1:1..495, K02876.1:1..300, K02877.1:1..300, 1..500, K02879.1:1..500, K02880.1:1..100, K02881.1:1..200, K02882.1:1..52)				
	/gen = "IGHD"				
SCD	unión (K02875.1:101..403, K02876.1:101..202, K02877.1:101...172, 101..424, K02879.1:101..424, K02881.1:25..182, K02882.1:44..52)				
	/parcial				
	/gen = "IGHD"				
	/nota = "enlace de membrana"				
	/comienzo_codón = 3				
	/producto = "cadena delta de inmunoglobulina"				
	/n.º_proteína = "AAA52771.1"				
	/db_xref = "GI: 495872"				
	/db_xref = "GDB G00-120 -084"				
	/translation= *PTKAPDVFPITISGRHPKDNFPVVLACLI TGYHPTSVTVTWYMG TQSQPQRTFPEIQRRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE PKAQASSVPTAQPAEGLAKATTAPATTRNTGRGGEKKCKEKEEQEERETKTEPC PSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEIGL LERHNSGSQSQHSRLTLPRSLWAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVCLSL NLLASSDPPPEASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSCFAPARPPPPRSTTFW ANSVLRYVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYLANTPLIPQSKDENSDD YTTFDVGSLLWTLSTFVALPILTLLYSGIVTFIKVK*				

FIGURA 7X

SCD

unión (K02875.1:101..403, K02876.1:101..202, K02877.1:101...172, 101..424, K02879.1:101..424, K02880.1:25..53)

/parcial

/gen = "IGHD"

/nota = "forma secretada"

/comienzo_codón = 3

/producto = "cadena delta de inmunoglobulina"

/nº_proteína = "AAA52770.1"

/db_xref = "GI: 495871"

/db_xref = "GDB G00-120 -084"

/translation=*PTKAPDVFPILSGCRHPKONSPVVLACLITGYHPTSVTVTWYMG
TQSQPQRTFPEIQRRDSYYMTSSQLSTPLQWROGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE
PKAQASSVPTAQPOAEGSLAKATTAPATTNTGRGGEEKKEKEKEEERETKTPEC
PSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGL
LERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWAGTSVTCTLNHPSLPQRLMALREPAQAQPVKLSL
NLASDDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSQFAPARPPPPRSTTFW
AHSVLKVPAPPSPQATYTCVWSHEDSRTLNASRSLEVSIVTDHGPMK*

CONTADOR BASE	93 a	171 c	157 g	79 t
ORIGEN	sobre 450 bp tras el segmento 3; 131 bp aguas arriba del sitio Accl.			
1	gaagctgggg	agaggagagc	acagtgggta	agtcagctccc
61	aggtccggcc	acagctgctc	tcgtttgctc	tcccttgca
121	cctcttgccg	tctacctgct	aaaccttgca	gtgcaggacc
181	accttcacct	gcttcgtggc	gggcagtgc	ctgaaggatg
241	gctgggaagg	tccccacagg	gggcgtggag	gaagggtgc
301	ccccagagcc	agcacagccg	tctgacctcg	cccaggtcct
361	gtcactctga	cactgaacca	tcccagctc	ccacccaga
421	cccggtgagc	ctggctccca	ggtggggaga	gaagggtgcc
481	gcccgcacca	gggccatgac		

[SEC ID N.º: 30]

K02879 Ig humana de germline...[gi: 184769] PubMed, Proteína, Secuencias Relacionadas, Taxonomía, OMIM, LinkOut

LOCUS	HUMIGCH05	500 bp	ADN	PRI	08-NOV-1994
DEFINICIÓN	Gen de la región C de la cadena de Ig delta-H de germline humana, dominio C delta-3 (linfocito LLC).				
N.º ACCESO	K02879				
VERSIÓN	K02879.1 GI: 184769				
PALABRAS CLAVE	región C; germline, cadena pesada de inmunoglobulina; cadena delta de inmunoglobulina.				
FUENTE	ADN de Homo sapiens (paciente individual aislado con leucemia linfocítica crónica (LLC))				
ORGANISMO	Homo sapiens Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos; Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.				
REFERENCIA	1 (bases 1 a 500)				
AUTORES	White, M.B., Shen, A.L., Word, C.J., Tucker, P.W. y Blattner, F.R.				
TÍTULO	Human immunoglobulin D: genomic sequence of the delta heavy chain				
REVISTA	Science 228 (4700), 733-737 (1985)				
MEDLINE	85192522				
COMENTARIO	Véase segmento 1				
CARACTERÍSTICAS	Situación/Calificadores				
fuerce	1..500 /organismo = "Homo sapiens" /aislamiento = "Paciente con leucemia linfocítica crónica (LLC)" /db_xref = "taxón: 9606" /mapa = "14q32.33" /tipo_célula = "linfocito" /germline				
intrón	<1..100 /gen = "IGHD" /nota = "G00-120-084" /número = 4				
exón	101..424 /gen = "IGHD" /nota = "dominio C delta-3; G00-120 -084; putativo" /número = 5				

FIGURA 7Y

intrón	425..>500 /gen = "IGHD" /nota = "G00-120-084" /número = 5
gen	unión (K02875. 1:1..495, K02876.1: 1..300, K02877.1:1..300, K02878.1:1..500, 1..500, K02880.1:1..100,K02881.1:1..200, K02882.1:1..52) /gen = "IGHD"
SCD	unión (K02875.1:101..403, K02876.1:101..202, K02877.1:101...172, K02878.1:101..424, 101..424, K02881.1:25..182, K02882.1:44..52) /parcial /gen = "IGHD" /nota = "enlace de membrana" /comienzo_codón = 3 /producto = "cadena delta de inmunoglobulina" /n.º_proteína = "AAA52771.1" /db_xref = "GI: 495872" /db_xref = "GDB G00-120 -084" /translation="PTKAPDVFPITISGCRHPKDNSPVVLACLITGYHPTSVTVTWYMG TQSQPQRTTFPEIQRRDSYMTSSQLSTPQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE PKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEQEERETKTPEC PSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGL LERHNSGSQSQHSRLTLPRSLWNAAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVCLSL NLLASDPPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPPQPRSTTFW ANSVLRVPAPPSPPQATYTCVSHEDSRTLLNASRSLEVSYLANTPLIPQSKDENSDD YTTFDVGSMLTTLSTFVALFILTLTYSGIVTFIKVK"
SCD	unión (K02875.1:101..403, K02876.1:101..202, K02877.1:101...172, K02878.1:101..424, 101..424, K02880.1:25..53) /parcial /gen = "IGHD" /nota = "forma secretada" /comienzo_codón = 3 /producto = "cadena delta de inmunoglobulina" /n.º_proteína = "AAA52770.1" /db_xref = "GI: 495871" /db_xref = "GDB G00-120 -084" /translation="PTKAPDVFPITISGCRHPKDNSPVVLACLITGYHPTSVTVTWYMG TQSQPQRTTFPEIQRRDSYMTSSQLSTPQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE PKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEQEERETKTPEC PSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGL LERHNSGSQSQHSRLTLPRSLWNAAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVCLSL NLLASDPPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPPQPRSTTFW ANSVLRVPAPPSPPQATYTCVSHEDSRTLLNASRSLEVSYLTDHGFPMK"
CONTADOR BASE	85 a 188 c 145 g 82 t
ORIGEN	sobre 150 bp tras el segmento 4; 118 bp aguas arriba del sitio HindIII.

```

1 ccacaggaaa ggagaaagga ggcaccacac cctggccggc cccacccccc tcccagtggc
61 cccgtggcca gagcctgaca gccccccac ccccccgag ctgcgcaggc acccgtcaag
121 cttctctga acctgctggc cctgctgac cccccgagg cggcctcgtg gctcctgctg
181 gaggtgctg gcttctcgcc ccccaacac ctcctgatg ggctggagga ccagcgtgag
241 gtgaacactt ctgggttgc ccccgacgc cccctccac agcccgagg caccacgttc
301 cgggcctgga gtgtgctgct gtcctcagc cgcctcagc ctcagccagc caccctacag

```

FIGURA 7Z

361 tgtgtggtca gccacgagga ctcccggact ctgctcaacg ccagccggag cctagaagtc
 421 agctgtgagt caccctcagg ccagggttgg gacggggact ctgagggggg ccataaggag
 481 ctggaatcca cactaggcag

[SEC ID N.º: 33]

K01311. IgD humana de germline...[gi: 184716] PubMed, Proteína, Taxonomía, OMIM

LOCUS	HUMIGCB9	106 bp	ADN	PRI	12-ABR-2001
DEFINICIÓN	Región de la cadena J de IgD delta de germline humana: C-delta CH1				
N.º ACCESO	K01311				
VERSIÓN	K01311.1 GI: 184716				
PALABRAS CLAVE	región C; germline; cadena pesada de inmunoglobulina; cadena delta de inmunoglobulina.				
FUENTE	humano				
ORGANISMO	Homo sapiens				
	Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos;				
	Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.				
REFERENCIA	1 (bases 1 a 106)				
AUTORES	Rabbitts, T.H., Forster, A. y Milstein, C.P.				
TÍTULO	Human immunoglobulin heavy chain genes: evolutionary comparisons of C mu, C delta, and C gamma genes and associated switch sequences				
REVISTA	Nucleic Acids Res. 9 (18), 4509-4524 (1981)				
MEDLINE	82059479				
PUBMED	6795593				
COMENTARIO	La secuencia de aminoácidos deducida se compara en (1) para la unión cadena J/C delta-1 de la proteína ER1 humana. El gen delta aparece sólo en 5 kb desde la región mu. Los autores (1) no pudieron detectar ninguna secuencia de conmutación adyacente al gen delta y afirman que esto implica que no tienen lugar una conmutación mu/delta mediante un proceso de conmutación de clase. Especulan que toda la región VH- (C-mu) - (C-delta) se transcribe a una molécula precursora nuclear que se rompe más tarde. Esto es parte de una región multigénica que contiene la región J, región de conmutación, genes C-mu-secretado, C-mu-membrana y C-delta.				
CARACTERÍSTICAS	Situación/Calificadores				
fuelle	1..106				
	/organismo = "Homo sapiens"				
	/db_xref = "taxón: 9606"				
	/mapa = "14q32.33"				
	/tipo_célula = "linfocito"				
	/tipo_tejido = "placenta"				
	/tipo_tejido = "hígado"				
	/fase_desarrollo = "feto"				
	/germline				
	/tejido_lib = "lawn et al."				
gen	<1..106				
	/gen = "IGHD"				
intrón	<1..26				
	/gen = "IGHD"				
	/nota = "intrón delta J-C; G00-120 -084"				
SCD	<27..>106				
	/gen = "IGHD"				
	/nota = "región C - dominio CH1"				
	/comienzo_codón = 3				
	/producto = "cadena delta de inmunoglobulina"				
	/nº_proteína = "AAB59423.1"				
	/db_xref = "GI: 184735"				
	/traducción = "PTKAPDVFPIISGCRHPKDNPPVLA"				
CONTADOR BASE	24 a	38 c	24 g	20 t	
ORIGEN					

1 tgcaccccca ggactctgtc tccagcacc caccaggct ccggatgtgt tccccatcat
 61 accagggtgc agacacccaa aggataacag cctgtgtgtc ctggca

[SEC ID N.º: 58]

K02880. IgD humana de germline...(gi: 184770) PubMed, Proteína, Secuencias Relacionadas, Taxonomía, OMIM, LinkOut

FIGURA 7AA

LOCUS	HUMIGH06	100 bp	ADN	PRI	08-NOV-1994
DEFINICIÓN	Genes de la cadena de IgD de germline humana, región C, terminal secretado.				
N.º ACCESO	K02880				
VERSIÓN	K02880.1 GI: 184770				
PALABRAS CLAVE	región C; germline; cadena pesada de inmunoglobulina; cadena delta de inmunoglobulina.				
FUENTE	ADN de Homo sapiens (paciente individual aislado con leucemia linfocítica crónica (LLC))				
ORGANISMO	Homo sapiens Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos; Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.				
REFERENCIA	1 (bases 1 a 100)				
AUTORES	White, M.B., Shen, A.L., Word, C.J., Tucker, P.W. y Blattner, F.R.				
TÍTULO	Human immunoglobulin D: genomic sequence of the delta heavy chain				
REVISTA	Science 228 (4700), 733-737 (1985)				
MEDLINE	85192522				
COMENTARIO	Véase segmento 1				
CARACTERÍSTICAS	Situación/Calificadores				
fuente	1..100 /organismo = "Homo sapiens" /aislamiento = "Paciente con leucemia linfocítica crónica (LLC)" /db_xref = "taxón: 9606" /mapa = "14q32.33" /tipo_célula = "linfocito" /germline				
intrón	<1..>100 /gen = "IGHD" /nota = "G00-120-084"				
intrón	/número = 5 <1..24 /gen = "IGHD" /nota = "G00-120-084"				
exón	/número = 5 25..>53 /gen = "IGHD" /nota = "dominio terminal secretado; G00-120 -084"				
gen	/número = 6 unión (K02875.1:1..495, K02876.1:1..300, K02877.1:1..300, K02878.1:1..500, K02879.1:1..500, 1..100, K02881.1:1..200, K02882.1:1..52) /gen = "IGHD"				
SCD	unión (K02875.1:1..403, K02876.1:1..202, K02877.1:1..172, K02878.1:1..424, K02879.1:1..424, 25..53) /parcial /gen = "IGHD" /nota = "forma secretada" /comienzo_codón= 3 /producto = "cadena delta de inmunoglobulina" /n.º proteína = "AAA52770.1" /db_xref = "GI: 495871" /db_xref = " GDB: G00-120 -084" /translation= "PTKAPDVFPPIISGCRHPKDNSPVVLACLIITGYHPTSVTVTYMG TQSQPQRTFPEIQRRDSYYMTSSQLSTPLQWHRQGEYKCVVQHTASKSKCEIFRWPE PKAQASSVPTAQPOAEGSLAKATTAPATTTRNTGRGGEKKKKKEKEEQEERETKTPEC PSHTOPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTHEVAGKVPVGGVEEGL LERHNSGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVVKLSL NLLASSDPPEAASHLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPQPRSTTFW AHSVLRVPAPPSQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDHGPVK"				
CONTADOR BASE	24 a	33 c	22 g	21 t	
ORIGEN	Sobre 1,8 kb tras segmento 5				
	1 gacacgcgcga tttcttggtt tttagatgtaa cagaccatgg ccccatgaaa tgatccccga 61 ccagatccgt cgcacccgc cactcagcag ctctggccga				

[SEC ID N.º: 36]

FIGURA 7BB

K02881. IgD humana de Germline...[gi: 184771] PubMed, Proteína, Secuencias Relacionadas, Taxonomía, OMIM, LinkOut

LOCUS	HUMIGH07	200 bp	ADN	PRI	08-NOV-1994
DEFINICIÓN	Genes de la cadena de IgD de germline humana, región C, primer dominio de membrana terminal				
N.º ACCESO	K02881				
VERSIÓN	K02881.1 GI: 184771				
PALABRAS CLAVE	región C; germline; cadena pesada de inmunoglobulina; cadena delta de inmunoglobulina.				
FUENTE	ADN de Homo sapiens (paciente individual aislado con leucemia linfocítica crónica (LLC))				
ORGANISMO	Homo sapiens Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos; Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.				
REFERENCIA	1 (bases 1 a 200)				
AUTORES	White, M.B., Shen, A.L., Word, C.J., Tucker, P.W. y Blattner, F.R.				
TÍTULO	Human immunoglobulin D: genomic sequence of the delta heavy chain				
REVISTA	Science 228 (4700), 733-737 (1985)				
MEDLINE	85192522				
COMENTARIO	Véase segmento 1				
CARACTERÍSTICAS	Situación/Calificadores				
fuerce	1..200 /organismo = "Homo sapiens" /aislamiento = "Paciente con leucemia linfocítica crónica (LLC)" /db_xref = "taxón: 9606" /mapa = "14q32.33" /tipo_célula = "linfocito" /germline				
intrón	<1..24 /gen = "IGHD" /nota = "G00-120-084" /número = 5				
exón	25..182 /gen = "IGHD" /nota = "primer dominio de membrana terminal; G00-120-084, putativo" /número = 6				
intrón	183..>200 /gen = "IGHD" /nota = "G00-120-084" /número = 6				
gen	unión (K02875.1:1..495, K02876.1:1..300, K02877.1:1..300, K02878.1:1..500, K02879.1:1..500, K02880.1:1..100, 1..200, K02882.1:1..52) /gen = "IGHD"				
SCD	unión (K02875.1:1..403, K02876.1:1..202, K02877.1:1..172, K02878.1:1..424, K02879.1:1..424, 25..182.1:44..52) /parcial /gen = "IGHD" /Nota = "enlace de membrana" /comienzo_codón = 3 /producto = "cadena delta de inmunoglobulina" /nº_proteína = "AAA52771.1" /db_xref = "GI: 495872" /db_xref = " GDB: G00-120 -084"				
	/translation=PTKAPDVFPPIISGCRHPKONSPVVLACITGYHPTSVTVTWYMG TQSQPORTFFPEIQRRDSYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE PKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEQEERETKTPEC PSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGL LERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPORLMALREPAQAAPVKLSL NLLASSDPPEAASHLLCEVSGFSPNNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPQPRSTTFW AHSVLRVPAPPSPQATYTCVSHEDSRITLLNASRSLEVSYLAMTPLIPQSKDENSDD YTTFDVGLWTLSTFVALFILTLLYSGIVTFIKVK"				
CONTADOR BASE	37 a	72 c	49 g	42 t	

FIGURA 7 CC

ORIGEN Sobre 800 bp tras segmento 6.

```

1  cgctcggecc cggctcctcc ccagacctgg ccctgacccc cctgacccct cagagcaagg
61 atgagaacag cgatgactac acgacctctg atgatgtggg cagcctgtgg accaccctgt
121 ccacgcttct ggccctcttc atcctcacc cctctacag cggcattgtc actttcata
181 aggtcagggg agcggccagg

```

[SEC ID N.º: 38]

K02882. IgD humana de germline...[gi: 184772] PubMed, Proteína, Secuencias Relacionadas, Taxonomía, OMIM, LinkOut

LOCUS	HUMIGH08	100 bp	ADN	PRI	08-NOV-1994
DEFINICIÓN	Genes de la cadena de IgD de germline humana, región C, segundo dominio de membrana terminal				
N.º ACCESO	K02882				
VERSIÓN	K02882.1 GI: 184772				
PALABRAS CLAVE	región C; germline; cadena pesada de inmunoglobulina; cadena delta de inmunoglobulina.				
FUENTE	ADN de Homo sapiens (paciente individual aislado con leucemia linfocítica crónica (LLC))				
ORGANISMO	Homo sapiens Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos; Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.				
REFERENCIA	1 (bases 1 a 100)				
AUTORES	White, M.B., Shen, A.L., Word, C.J., Tucker, P.W. y Blattner, F.R.				
TÍTULO	Human immunoglobulin D: genomic sequence of the delta heavy chain				
REVISTA	Science 228 (4700), 733-737 (1985)				
MEDLINE	85192522				
COMENTARIO	Véase segmento 1				
CARACTERÍSTICAS	Situación/Calificadores				
fuente	1..100 /organismo = "Homo sapiens" /aislamiento = "Paciente con leucemia linfocítica crónica (LLC)" /db_xref = "taxón: 9606" /mapa = "14q32.33" /tipo_célula = "linfocito" /germline				
intrón	<1..43 /gen = "IGHD" /nota = "IgD-Mb" /número = 6				
exón	44..>52 /gen = "IGHD" /nota = "enlace de membrana (segundo dominio de membrana terminal); G00-120-084, putativo" /número = 7				
gen	unión (K02875.1:1..495, K02876.1:1..300, K02877.1:1..300, K02878.1:1..500, K02879.1:1..500, K02880.1:1..100, 1..200, K02881.1:1..52) /gen = "IGHD"				
SCD	unión (K02875.1:1..403, K02876.1:1..202, K02877.1:1..172, K02878.1:1..424, K02879.1:1..424, K02881.1:25..182.1:44..52) /parcial /gen = "IGHD" /nota = "enlace de membrana" /comienzo_codón = 3 /producto = "cadena delta de inmunoglobulina" /n.º_proteína = "AAA52771.1" /db_xref = "GI: 495872" /db_xref = "GDB: G00-120 -084" /translation=PTKAPDVFPPIISGCRHPKONSFPVVLACITGYHPTSVTVTWYMG TQSQPQRTTFPEIQRRDSYMTSSQLSTPLQQNRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE PKAQASSVPTAQFQAEGLAKATTAPATTNTGRGGEEXKXKEKEEQEERETKTPEC PSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTHEVAGKVPTGGVEGL LERHNSGSQSQSRLTLPRSLWNAAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAQAPVQLSL NLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPQPRSTTFW				

FIGURA 7DD

ANSVLRVPAPPSQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYLAMTPLIPQSDENSDD
 YTTFDVGSLLWTTLSFTFVALFILTLVSGIVTFIKVK*
 CONTADOR BASE 22 a 30 c 30 g 18 t
 ORIGEN Sobre 1,3 kb tras segmento 7.
 1 tcaggctcttc agccctctgc tgacccacagg ggctgtctctt caggctgaagt agccccagaa
 61 gagcaggacg ccctgtacct gcagagaagg gaagcagcct

[SEC ID N.º: 40]

K02875. IgD humana de germline...[gi: 184765] PubMed, Proteína, Secuencias Relacionadas, Taxonomía, OMIM, LinkOut

LOCUS	HUMIGCH01	495 bp	ADN	PRI	08-NOV-1994
DEFINICIÓN	Genes de la cadena de IgD de germline humana, región C, dominio C delta-1				
N.º ACCESO	K02875				
VERSIÓN	K02875.1 GI: 184765				
PALABRAS CLAVE	región C; germline; cadena pesada de inmunoglobulina; cadena delta de inmunoglobulina.				
FUENTE	ADN de Homo sapiens (paciente individual aislado con leucemia linfocítica crónica (LLC))				
ORGANISMO	Homo sapiens Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos; Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.				
REFERENCIA	1 (bases 1 a 495)				
AUTORES	White, M.B., Shen, A.L., Word, C.J., Tucker, P.W. y Blattner, F.R.				
TÍTULO	Human immunoglobulin D: genomic sequence of the delta heavy chain				
REVISTA	Science 228 (4700), 733-737 (1985)				
MEDLINE	85192522				
COMENTARIO	La secuencia en formato legible por ordenador y el borrador de entrada (1) fueron gentilmente cedidos por M. B. Blanco, 06-AGO-1985. Los extremos de los exones C-delta y delta-s se localizaron comparando las secuencias traducidas con las secuencias conocidas AA (1).				
CARACTERÍSTICAS	Situación/Calificadores				
fuelle	1..495 /organismo = "Homo sapiens" /aislamiento = "Paciente con leucemia linfocítica crónica (LLC)" /db_xref = "taxón: 9606" /mapa = "14q32.33" /tipo_célula = "linfocito" /germline				
gen	unión (1..495, K02876.1:1..300, K02877.1:1..300, K02878.1:1..500, K02879.1:1..500, K02880.1:1..100, 1..200, K02881.1:1..200, K02882.1:1..52) /gen = "IGHD"				
intrón	<1..100 /gen = "IGHD"				
SCD	/nota = "intrón J-C; G00-120 -084" unión (101..403, K02876.1:1..202, K02877.1:101..172, K02878.1:1..424, K02879.1:1..424, K02880.1:25..53) /parcial /gen = "IGHD" /nota = "forma secretada" /comienzo_codón = 3 /producto = "cadena delta de inmunoglobulina" /n.º_proteína = "AAA52770.1" /db_xref = "GI: 495871" /db_xref = "GDB: G00-120 -084"				
exón	/translation = "PTKAPDVFPFIISGCRHPKDNSPVVLA CLITGYHPTSVTVTWYHG TQSQPQRTFPEIQRRDSYMTSSQLSTPLQOWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRNPE PKAQASSVPTAQPOAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEEQEERETKTPEC PSHTQPLGVYLLTPAVQDLNLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPVTGQVEEGL LERHNSGQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPQRLMALREPAQAPVKLSL NLLASSDPPEAASHLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPQPRSTTFW ANSVLRVPAPPSQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVS YVTDHGPMK*				
	101..403 /gen = "IGHD" /nota = "dominio constante delta-1; G00-120 -084; putativo"				

FIGURA 7EE

SCD /número = 1
 unión (101..403, K02876.1:1..202, K02877.1:101..172, K02878.1:1..424,
 K02879.1:1..424, K02881.1:25..182, K02882.1:44..52)
 /parcial
 /gen = "IGHD"
 /nota = "enlace de membrana"
 /comienzo_codón = 3
 /producto = "cadena delta de inmunoglobulina"
 /n.º proteína = "AAA52771.1"
 /db_xref = "GI: 495872"
 /db_xref = "GDB: G00-120 -084"
 /translation="PTKAPDVFPILISGCRHPKDN SPVVLACLITGYHTSVTVTWYMG
 TQSOPORTFPEIQRRDSYMTSSQLSTPLQOWRQGEYKCVVQHTASKSKCEIFRWPE
 PKAQASSVPTAOPQAEGLAKATTAPATTRNTORGGEKKKEKEKEEQEERETKTPEC
 PSHTQPIGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGL
 LERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPQRLMALREPAQAQPVKLSL
 NLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPRSTTFW
 AHSVLRVPAPPSPQPATYTCVSHEDSRTLNASRSLEVSYLAMTPLIPQSKDENSDD
 YTFDDVGSLLWTTLTSTFVALFILTLTLYSGIVTFIKVK"
 intrón 404..>495
 /gen = "IGHD"
 /nota = "G00-120-084"
 /número = 1
 CONTADOR BASE 114 a 179 c 120 g 82 t
 ORIGEN 182 bp aguas arriba del sitio SphI; cromosoma 14p32.3.

```

1  ttccctgcc tcccgtcacc ctgcggccag ggcctctgcc ctgccctgcc ccttgctcctc
61 aggtctccag cctcagacc ccactgtgtc tgccttccag caccaccaa ggctccggat
121 gtgttcccca tcatatcagg gtgcagacac ccaaggata acagccctgt ggtcctggca
181 tgcttgataa ctgggtacca cccaacgtcc gtgactgtca cctggtacat ggggacacag
241 agccagcccc agagaacctt ccttgagata caagacggg acagctacta catgacaagc
301 agccagctct ccacccccct ccagcagtgg cgccaaggcg agtacaaatg cgtggtccag
361 cactactgcca gcaagagtaa gaaggagatc tccgctggc caggtaggtc gcaccggaga
421 tcacccagaa gggcccccca ggacccccag caccctccac tcagggcctg accacaaaga
481 cagaagcaag ggctg

```

[SEC ID N.º: 42]

VIII. REGIÓN C DE CADENA DE LA IG ÉPSILON HUMANA - HOMO SAPIENS (HUMANO)

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

>sp |P01880| DTC_REGIÓN C DE CADENA DE LA IG ÉPSILON HUMANA - Homo sapiens (Humano)

10	20	30	40	50	60
ASTQSPSVFP	LTRCCKNIPS	NATSVTLGCL	ATGYFPEPVM	VTWDTGSLNG	TTMTLPATTL
70	80	90	100	110	120
TLSGHYATIS	LLTVSGAWAK	QMFTCRVAHT	PSSTDWVDNK	TFSVCSRDF	PPTVKILQSS
130	140	150	160	170	180
CDGGGHFPPT	IQLLCLVSGY	TPGTINITWL	EDGQVMDVDL	STASTTQEGE	LASTQSELT
190	200	210	220	230	240
SQKHWLSDR	YTCQVTYQGH	TFEDSTKKCA	DSNPRGVSAY	LSRPSPFDLF	IRKSPTITCL
250	260	270	280	290	300
VVDLÅPSKGT	VNLWTSRASG	KPVNHSTRKE	EKQRNGTLTV	TSTLPVGTRD	WIEGETYQCR

FIGURA 7FF

```

      310      320      330      340      350      360
      |      |      |      |      |      |
VTHPHLPRAL MRSTTKTSGP RAAPEVYFAF TPEWPGSRDK RTLACLIQNF MPEDISVQWL

      370      380      390      400      410      420
      |      |      |      |      |      |
HNEVQLPDAR HSTTQPRKTK GSGFFVFSRL EVTRAWEQK DEFICRAVHE AASPSQTVQR

      428
      |
AVSVNPGK

```

[SEC ID N.º: 49]

SECUENCIA DE CODIFICACIÓN

```

atggactgga cctggatccc ctctctgggtg gcagcagcca cgcgagtcca ctcccagacg      60
cagtcggtag agtcctggggc tggggcgagg aagcctgggg catcagttag ggtctcttgc      120
aaggctctctg gatcacacct catcgactcc tatatccact ggatacgaca ggccccctggg      180
cacgggcttg agtgggtggg atggatcaac cctaacagtg gtggcacaaa ctatgctccg      240
agatttcagg gcagggtcac catgaccaga gacgcgtcct tcagtacage ctacatggac      300
ctgagaagtc tgagatctga cgaactcgcc gtgttttact gtgcgaaaag tgacctcttt      360
tggagtgaat attataactt tgactactcg taaactttgg acgtctgggg ccaagggacc      420
acggctcaccg tctcctcagc ctccacacag agcccatccg tctccccctt gacccgctcg      480
tgcaaaaaca ttccctccaa tgcaacctcc gtgactctgg gctgcctggc caggggtac      540
ttccccggagc cggtgatggg gacctgggac acagggtccc tcaacgggac aactatgacc      600
ttaccagcca ccacctccac gctctctggg cactatgcca ccatcagctt gctgaccgtc      660
tcgggtgctg gggccaagca gartgttacc tgcctggtgg cacacactcc atcgtccaca      720
gactgggtcg acaacaaaac ctccagctgc tgcctcaggg acttcacccc gccaccgtg      780
aagatcttac agtcgtcttg cgaaggcggt gggcacttcc ccccgacctt ccagctcttg      840
tgctctgctt ctgggtacac cccagggact atcaacatca cctggctgga ggacgggacg      900
gtcaaggacg tggactctgc caccgctctt accacgcagg aggggtgagc ggcctccaca      960
caaagcgagc tcaacctcag ccagaagcac tggctgtcag accgcacctt cactgtccag      1020
gtcaccctac aaggtcacac ctcttgaggc agcaccacga agtgtgcaga ttccaacctg      1080
agaggggtga gcgcctacct aagccggccc agcccgctcg acctgttcat ccgcaagtcg      1140
cccacgatca cctgtctggg ggtggacctg gcacccagca aggggagcgt gaacctgacc      1200
tggctcccggg ccagtgggaa gctgtgaac cactccacca gaagggaggg gaagcagcgc      1260
aatggcacgt taaccgtcac gtccaccttg ccgggtggga cccgagactg gatcgagggg      1320
gagacctacc agtcaggggt gacccacccc cactgtccca gggccctcat gcgggtccacg      1380
accaagacca gtcggccgcg tgcctgcccc gaagtctatg cgtttgcgac gccggagtgg      1440
ccggggagcc gggacaagcg caccctcgcc tgcctgatcc agaacttcat gcctgaggac      1500
atctcggtag agtggctgca caacgaggtg cagctcccgg acgcccggca cagcacgacg      1560
cagccctgca agaccaaagg ctccggcttc ttcgtcttca gccgcctgga ggtgacctagg      1620
gccgaatggg agcagaagaa tgagttcatc tgcctgacg tccatcagggc agcgaagccc      1680
tcacagacgg tccagcgagc ggtgtctgta aatccccgta aatga      1725

```

[SEC ID N.º: 44]

GenBank

L00022	Ig humana activa
LOCUS	HUMIGHAE2 1920 bp ADN PRI 22-DIC-1994
DEFINICIÓN	Genes de la cadena pesada épsilon-1 de Ig activa humana, región constante
N.º ACCESO	L00022 J00227 V00555
VERSIÓN	L00022.1 GI: 185035
PALABRAS CLAVE	región C; inmunoglobulina épsilon; cadena pesada de inmunoglobulina; gen procesado.
FUENTE	Línea celular de mieloma humano 266B1 ADN y cADN a mARN, clones H-Ig-épsilon-11, lambda-épsilon-1.2, pJJ71, pGET2 y K85/A12 (véase comentario).
ORGANISMO	Homo sapiens
	Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos;
	Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.
REFERENCIA	1 (bases 1 a 1920)
AUTORES	Flanagan, J.G. y Rabbitts, T.H.
TÍTULO	The sequence of a human immunoglobulin epsilon heavy chain constant region gene, and evidence for three non-allelic genes
REVISTA	EMBO J. 1 (5), 655-660 (1982)

FIGURA 7GG

MEDLINE	84236029
REFERENCIA	2 (bases 528 a 736; 1044 a 1138)
AUTORES	Nishida, Y., Miki, T., Hisajima, H. y Honjo, T.
TÍTULO	Cloning of human immunoglobulin epsilon chain genes: evidence for multiple C epsilon genes
REVISTA	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 (12), 3833-3837 (1982)
MEDLINE	82247945
REFERENCIA	3 (bases 1 a 1920)
AUTORES	Kenten, J.H., Molgaard, H.V., Houghton, M., Derbyshire, R.B., Viney, J., Bell, L.O. y Gould, H.J.
TÍTULO	Cloning and sequence determination of the gene for the human immunoglobulin epsilon chain expressed in a myeloma cell line
REVISTA	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 (21), 6661-6665 (1982)
MEDLINE	83065234
REFERENCIA	4 (bases 98 a 1884)
AUTORES	Seno, M., Kurokawa, T., Ono, Y., Onda, H., Sasada, R., Igarashi, K., Kikuchi, M., Sugino, Y., Nishida, Y. y Honjo, T.
TÍTULO	Molecular cloning and nucleotide sequencing of human immunoglobulin epsilon chain cDNA
REVISTA	Nucleic Acids Res. 11 (3), 719-726 (1983)
MEDLINE	83168897
REFERENCIA	5 (bases 691 a 807; 1571 a 1818; 1860 a 1885)
AUTORES	Liu, F. T., Albrandt, K. A., Bry, C. G. y Ishizaka, T.
TÍTULO	Expression of a biologically active fragment of human IgE epsilon chain in Escherichia coli
REVISTA	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 (17), 5369-5373 (1984)
MEDLINE	84298140
COMENTARIO	(2) y (1) indican el aislamiento de otros dos genes epsilon, epsilon-2 y epsilon-3. Los autores (2) reivindican que epsilon-3 es un pseudogén. Max, et al. (Cell 29, 691-699 (1982)) lo comparan en (4) con la secuencia de la región C y encuentran 3 diferencias con respecto a los nucleótidos. La secuencia de aminoácidos que se deduce en (4) difiere en cierta medida con la secuencia de la región C publicada. (5) expresión producida de la IgE en E. coli mediante la inserción dentro del vector de expresión pUC7. Fuente de información completa: Línea celular de mieloma humano 266B1 ADN (2), (1), (5) y cADN a mRNA (3), (4), clones H-Ig-epsilon-11 (2), lambda-epsilon-1.2 (1), pJJ71 (3), pGET2 (4) y K85/A12 (5).
CARACTERÍSTICAS	Situación/Calificadores
fuelle	1..1920 /organismo = "Homo sapiens" /db_xref = "taxón: 9606" /mapa = "14q32.33"
prim_transcripc.	<1..1886 /nota = "epsilon-1 mRNA"
intrón	<1..97 /gen = "IGHE" /nota = "epsilon-1 intrón J-C"
exón	98..406 /gen = "IGHE" /nota = "Cadena pesada de Ig epsilon-1 (dominio CH1); G00-119 -335"
intrón	407..613 /gen = "IGHE" /nota = "epsilon-1 intrón A"
exón	614..934 /gen = "IGHE" /nota = "Cadena pesada de Ig epsilon-1 (dominio CH2)"
conflicto	735 /gen = "IGHE" /cita = (3) /sustituir = " "
intrón	935-1020 /gen = "IGHE" /nota = "epsilon-1 intrón B"
exón	1021..1344

FIGURA 7HH

/gen = "IGHE"
 /nota = "Cadena pesada de Ig épsilon-1 (dominio CH3)"
 conflicto 1124
 /gen = "IGHE"
 /cita = (3)
 /sustituir = " "
 conflicto 1337
 /gen = "IGHE"
 /cita = (3)
 /sustituir = " "
 intrón 1345..1427
 /gen = "IGHE"
 /nota = "épsilon-1 intrón C"
 exón 1428..>1759
 /nota = "Cadena pesada de Ig épsilon-1 (dominio CH4)"
 conflicto 1444..1445
 /gen = "IGHE"
 /cita = (3)
 /sustituir = " "
 conflicto 1612
 /gen = "IGHE"
 /cita = (3)
 /sustituir = " "
 conflicto 1785
 /cita = (3)
 /sustituir = " "
 gen unión (L00021.1:57..495, 1..1758)
 /gen = "IGHE"
 SCD unión (L00021.1:57..495, 98..406, 614..934, 1021..1344, 1428..1759)
 /parcial
 /gen = "IGHE"
 /nota = "Cadena pesada de Ig épsilon-1 (dominio V-D-J)"
 /comienzo_codón = 1
 /n.º_proteína = "AAB59424.1"
 /db_xref = "GI: 386807"
 /db_xref = "GDB G00-119 -335"
 /translation="MDNTHILFLVAAATRVHSQTQLVQSGAEVRKPGASVRVSCKASG
 YTFIDSYIHWIRQAPGHLEWGVHINPNSGGTNYAPRFQGRVTMTDASFSTAYMDLR
 SLRSDSAVFYCAKSDPFWSDDYNNFDYSYTLQVWGQGTITVSSASTQSPSPVPLTRC
 CIGNIPSNATSVTLGLATGYFPEPVMVTWDTCSLNGTTMTLPATTLTSLGHYATISLL
 TVSQAWAKQMFTCRVAHTPSSTDWVDNKTFSVCSRDPPTPTVKILQSSCCGGGHFPPT
 IQLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTASTTOEGELASTQSELTLSQXHWLSD
 RYTCQVTYQGHTEFEDSTKKCADSNPROVSAYLSRSPFPDLFIRKSPFTITCLVVDLAP
 SKGTVNLTSRASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLVTSTLPVGTDRNIEGETYQCRVTHP
 HLPRLMRSTTKTSGPRAAPEVYAFATPENPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHN
 EVQLPDARHSTTQPRKTKSGGFFVFSRLEVTRAWEQKDEFICRAVHEAASPSQTVQR
 AVSVNPGK"

[SEC ID N.º: 60]

CONTADOR BASE 387 a 658 c 576 g 299 t
 ORIGEN tras unos 3 kb; 1 bp aguas arriba del sitio BamHI.

```

1 ggatccctgc caccgggtcc ccagctcccc catccaggcc cccagggctg atgggcgctg
61 gacctgaggct ggcactgact aggtctctgtc ctcacagcct ccacacagag cccatccgtc
121 tcccccttga cccgctgctg caaaaacatt ccttccaatg ccacctccgt gactctgggc
181 tgcctggcca cgggctactt cccggagccg gtgatgggtga cctgggacac aggtcccttc
241 aacgggacaa ctatgacctt accagccacc accctcacgc tctctggcca ctatgccacc
301 atcagcttgc tgaccgtctc gggctgcgtg gccaagcaga tggttacctg cegtgtggca
361 cactctccat cgtccacaga ctgggtcgac aacaaacatt ccagcggtaa gagagggtca
421 agctcagaga ccacagttct caggagctgc aggtcggagg ctggcagagt gggcagggtt
481 tgagggggtg ggtgggtcca aacgtgggaa caccagcat gcctggggac cggggccagg
541 acgtcggggc aagaggaggc caccagagc tcagagaggc caacaacccc catgaccacc
601 agctctcccc cagtctgtct cagggaacttc acccgcacca cegtgaagat cttacagctg
661 tccctgcgacg gcggcgggca cttccccctg atccatccag tccctgtgctt cgtctctggg
721 tacacccagc ggaactatca catcacctgg ctggaggagc ggcaggctcat ggacgtggac
781 ttgtccaccg cctctaccac gcaggagggt gagctggcct ccacacaaag cgagctcacc
  
```

FIGURA 7II

```

841 ctcagccaga agcactggct gtcagaccgc acctacacct gccaggtcac ctatcaaggt
901 cacacctttg aggcagcagc caagaagtgt gcaggtagct tcccacctgc cctgggtggcc
961 gccacggagg ccagagaaga ggggcgggtg ggccctcacac agccctccgg tgtaccacag
1021 attccaaccc gagaggggtg agcgcttacc taagcgggcc cagcccggtc gacctgttca
1081 tccgcaagtc gccacagatc acctgtcttg tggtagacct ggcacccagc aaggggagcg
1141 tgaacctgac ctgggtcccg gccagtgagg agcctgtgaa ccactccacc agaaaggagg
1201 agaaagcagc caatggcacg ttaaccgtca cgtccacctt gccgggtggc acccgagact
1261 ggaatcaggg ggaagacctc cagtgcaggg tgacccacct ccacctgccc agggccttca
1321 tgcgggtccac gaccaagacc agcgggtgag catgggcagg ccgggggtcgt gggggaaggg
1381 agggagcagc tgagcggggc ccggggtgac cccacgtctg gccacaggcc cgcgtgctgc
1441 cccggaagtc tatgctgtt cgcgcgggga gtggcggggg agccgggaca agcgcacctt
1501 cgcctgcctg atccagaact tcatgcctga ggacatctcg gtgcagtggc tgcacaacga
1561 ggtgcagctc ccggacgccc ggcacagcac gacgcagccc cgcacagcca agggctcccg
1621 ctctctctgc ttcagccgcc tggaggtgac cagggccgaa tgggagcaga aagatgagtc
1681 catctgctgt gcagctccatg aggcagcagc cccctcacag accgtccagc gacggtgtc
1741 tgaataatccc ggtaaatgac gtactcctgc ctccctccct cccagggctc catccagctg
1801 tgcagtgagg aggaactggc agacctctct tccactgttg caatgacccc aggaagctac
1861 ccccaataaa ctgtgectgc tcagagcccc agtacacca tctctgggag cgggcagggc

```

[SEC ID N.º: 59]

IX. REGIÓN C DE CADENA DE LA IG MU HUMANA - HOMO SAPIENS (HUMANO)

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

>sp |P01871| MUC_REGIÓN C DE CADENA DE LA IG MU HUMANA – Homo sapiens (Humano)

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |
GSASAPTLFP LVSCENSPSD TSSVAVGCLA QDFLPDSITF SWKYKNNSDI SSTRGFPSVL
      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |
RGGKYAATSQ VLLPSKDVNQ GTDEHVVKVQ QHPNGNKEKN VPLPVIAELP PKVSFVPPR
      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |
DGFFGNPRSK SKLICQATGF SPRQIQVSWL REGKQVGSQV TTDQVQAEAK ESGPTTYKVT
      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |
STLTIKESDW LSQSMFTCRV DHRGLTFOQN ASSMCVDDQD TAIRVFAIPP SFASIFLTKS
      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |
TKLTCLVTDL TTYDSVTLSW TRQNGEAVKT HTNISESHPN ATPSAVGEAS ICEDDWN5GE
      310     320     330     340     350     360
      |      |      |      |      |
RFTCTVTHTD LPSPLKQTIS RPKGVALHRP DVYLLPPARE QNLNRESATI TCLVTGFSPA
      370     380     390     400     410     420
      |      |      |      |      |
DVFVQWMQRG QPLSPERYVT SAPMPEQAP GRYFAHSILT VSEEEWNTGE TYTCVVAHEA
      430     440     450
      |      |      |
LPNRVTERTV DKSTGKPTLY NVSLVMSDTA GTCY

```

[SEC ID N.º: 47]

SECUENCIA DE CODIFICACIÓN

```

atggactgga cctggaggtt cctcctctgt gtggcagcag ctacaggtgt ccagtcctcag      60
gtgcagctgg tgcagctctg ggcctgaggt aagaagcctg ggtcctcggg gaaggtctcc      120
tgcaaggctt ctggaggcac cttcagcagc catgctatca gctgggtgag acagggccct      180
ggacaagggc ttgagtgag gggagggatc atccctatct ttggtacagc aaactacgca      240
cagaagttcc agggcagagt cagcatcacc gcggacgaat ccacgagcac agcctacatg      300

```

FIGURA 7JJ

```

gagctgagca gccctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgaa aaccggggatc 360
ctggggccgt atagcagtgg ctgggtacccg aactcggact actactacta cgggtatggac 420
gtctggggcc aaggggaccac gggtacccgtc tccctcaggga gtgcattccgc cccaaccctt 480
ttccccctcg tctcctgtga gaattccccg tcggatcaga gcagcgtggc cgttggctgc 540
ctcgcacagg acttccctcc cgaactccatc accttctctc ggaaatacaa gaacaactct 600
gacatcacga gcacccgggg ctccccatca gtccctgagag ggggcaagta cgcagccacc 660
tcacagggtgc tgcctgcttc caaggacgtc atgcaggggc. cagacgaaca cgtggctgac 720
aaagtcacgc accccaacgg caacaaagaa aagaacgtgc ctcttccagt gattgctgag 780
ctgcctccca aagttagcgt ctctgtccca cccgcgacg gcttctctcg caacccccgc 840
agcaagtcga agtcatctg ccaggccacg gggttccagt cccggcagat tcagggtgtcc 900
tggctgctcg aggggaagca ggtggggctt ggcgtcacca cggaccagggt gcaggtctgag 960
gccaaagagt ctgggcccac gacctacaag gtgacctagca cactgacctt caaagagagc 1020
gactggctca gccagagcat gtccacctgc cgcgtggatc acaggggcct gaccttccag 1080
cagaatgctg cctccatgtg tgtccccgat caagacacag ccatccgggt ctctgacctc 1140
cccccatcct ttgcccagcat ctccccacc aagtccacca agttgacctg cctgggtcaca 1200
gacctgacca cctatgacag cgtgacctat tcttggacct gccagaatcg cgaagctgtg 1260
aaaaaccaca ccaacatctc cgagagccac ccgaatggca ctctcagcgc cgtgggtgag 1320
gccagcatct gcgaggatga ctggaattcc ggggagaggt tcactgtcac cgtgacctac 1380
acagacctgc cctcgcctc gaagcagacc atctccccgc ccaagggggt ggccctgcac 1440
aggcccgatg tctacttgcg gccaccagcc cgggagcagc tgaacctgct ggagtcggcc 1500
accatcacgt gctcgtgtac gggcttctct cccgcggacg tcttctgtga gtggatgcag 1560
agggggcagc ccttgtctcc ggagaagtat gtgaccagcg cccaatgcc tgagccccag 1620
gccccaggcc ggtacttctc ccacagcacc ctgacctgtt ccgaagagga atggaaacag 1680
ggggagagct acacctgctg ggtggcccat gaggccctgc ccaacagggt caccgagagg 1740
acctgtggaca agtccaccga gggggagggt agcgccgacg agggagggtt tgagaacctg 1800
tgggcccacg cctccacctt catcgtctct tctctctga gcctctctca cagtaaccac 1860
gtcacctctg tcaaggtaga atga 1884

```

[SEC ID N.º: 46]

GenBank

X17115. mARN humano de IgH

LOCUS HSIGM201 2213 bp mARN PRI 03-ABR-1995

DEFINICIÓN Secuencia completa de mARN de cadena pesada de IgM humana

N.º ACCESO X17115

VERSIÓN X17115.1 GI: 33450

PALABRAS CLAVE cadena pesada de Ig; gen de IgM; cadena pesada de IgM; proteína transmembrana.

FUENTE humano

ORGANISMO Homo sapiens

Eucariotas; Metazoos; Cordados; Craneados; Vertebrados; Teleósteos;

Mamíferos; Euterios; Primates; Catarrinos; Homínidos; Homos.

REFERENCIA 1 (bases 1 a 2213)

AUTORES Friedlander, R. M.

TÍTULO Direct Submission

REVISTA Submitted (03-NOV-1989) Friedlander R. M., Harvard Medical School, Howard Hughes

Medical Institute, Department of Genetics, 25

Shattuck St, Boston, MA 02115, USA

REFERENCIA 2 (bases 1 a 2213)

AUTORES Friedlander, R. M., Nussenzweig, M. C. y Leder, P.

TÍTULO Complete nucleotide sequence of the membrane form of the human IgM heavy chain

REVISTA Nucleic Acids Res. 18 (14), 4278 (1990)

MEDLINE 90332450

REFERENCIA 3 (bases 1 a 2213)

AUTORES Kristensen, T., Loper, R. y Prydz, H.

TÍTULO An estimate of the sequencing error frequency in the DNA sequence databases

REVISTA DNA Seq. 2 (6), 343-346 (1992)

MEDLINE 93075997

OBSERVACIÓN Errata: I (fe de erratas publicada en DNA Seq 1993 ; 3 (5): 337))

COMENTARIO Para la secuencia genómica véase <K01306>, <X14939> y <X14940>. El autor menciona varios conflictos con estas secuencias. Datos revisados amablemente (30-MAY-1990) por Friedlander R. M.

CARACTERÍSTICAS Situación/Calificadores

fuente 1..2213

/organismo = "Homo sapiens"

/db_xref = "taxón: 9606"

FIGURA 7KK

/clon = "201-203"
 /línea celular = "linfoma 201"
 /tipo_célula = "B"
 /tipo_tejido = "linfóide"
 característica_misc 1..39
 /nota = "secuencia del VECTOR putativo Bluescript SKP+"
 /cita = (3)
 SCD 73..1956
 /nota = "precursor (AA -15 a 612)"
 /comienzo_codón = 1
 /nº_proteína = "CAA34971.1"
 /db_xref = "GI: 33451"
 /db_xref = "SWISS-PROT: P01871"
 /db_xref = "SWISS-PROT: P20769"
 /translation="MDWTRFLFVVAATGVQSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKAS
 GGTFSSYAISHVRQAPCGGLEHMGIIPIFGTANYAQKFGGRVTITADESTSTAYMEL
 SSLRSEDVAVYCAKGI LGPYSSGWYPNSDYTYGMDVHQQTITVSSGSASAPTL
 FPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWYKKNNSDISSTRGFPSVLGGKYA
 ATSQVLLPSKDVMGTDHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVPPRDGFF
 GNPRSKSLICQATGFSFPRQIQVSWLREGKQVSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTST
 LTIKESDWLSQSHTCRVDHRLTFQONASSMCPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKS
 TKLTCLVTDLTITDVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHFNATFSAVGEASICEDDWNS
 GERFTCTVTHIDLPSPKQITSRPKGVALHRPDVYLLPFAREQLNLRASATITCLVTG
 FSPADVFVQNMQRQPLSPEKYVTSAPMPFQAPGRYFAHSILTVSEEWNTGETTYTC
 VVAHEALPNRVTERTVQKSTEGEVSADEEGFENLWATASTFIVLFLSLFYSTTVTLF
 KVK"
 [SEC ID N.º: 52]
 péptidos_señal 73..117
 péptidos_mat 118..1953
 /producto = "cadena pesada de IgM (AA 1 a 612).
 sitio_poliA 2213
 /nota = "sitio_poliA"
 CONTADOR BASE 462 a 708 c 629 g 414 t
 ORIGEN
 1 gctctagaac tagtggatcc cccgggctgc aggaattctc taaagaagcc cctgggagca
 61 cagctcatca ccattggaactg gacctggagg ttcctctctg tggtaggcagc agctacaggc
 121 gtcaggctcc aggtgcagct ggtgcagctc ggggctgagg tgaagaagcc tgggctctcg
 181 gtgaaggctc cctgcaaggc ttctggaggc accttcagca gctatgctat cagctgggtg
 241 cgacaggccc ctggacaagg gcttgagtgg atgggaaggga tcatccctat ctttgggtaca
 301 gcaaaactacg cacagaagtc ccagggcaga gtacagatta ccgaggacga atccacgagc
 361 acagccatca tggagctgag cagcctgaga cctgaggaca cggccgtgta tctactgtcg
 421 aaaaaccggg tccctggggc gtatagcagt ggctggtaac cgaactcggg ctactactac
 481 tacggctatgg acgtctgggg ccaagggacc acggctacag tctcctcagg gagtgcattc
 541 gccccaacc ttttccccct cgtctcctgt gagaattccc cgtcggatag gaggcagctg
 601 gccgttggct gccctgcaca ggaacttctt cccgactcca tcaacttctc ctggaatatc
 661 aagaacaaact ctgacatcag cagcaccccg ggcttcccat cagtcttgag agggggcaag
 721 tacgcaagcca cctcacagggt gctgctgcct tccaaggagc tcatgcaggg cacagacgaa
 781 cagctggtgt gcaaaagtcca gcaccccaac ggcaacaaag aaaagaacgt gcctcttcca
 841 gtgattgtcg agctgcctcc caaagtgagc gtcttcgtcc caccctcgca cggttcttc
 901 ggcaaccctc gtagcnaagtc caagctcatc tgccaggcca cgggtttcag tccccggcag
 961 attcaggtgt cctggctgag cagggggaag caggtagggg ctggcgtcac caccgaccag
 1021 gtgcaggctg agggcaaaag gtctggggcc acgacctaca aggtgaccag cacactgacc
 1081 atcaaaagaga gctgactggc cagccagagc atgttcaact gccgctgga tcacaggggc
 1141 ctgaccttcc agcagaatgc gtctctccatg tgtgtccccg atcaagacac agccatctcg
 1201 gtctctcgcca tcccccatc ctttgccagc atcttctcca ccaagctcac caagtgcacc
 1261 tgcttggtca cagacctgac caccatgac agcgtgacca tctcctggac ccgccagaa
 1321 ggcaaaagctg tgaaaaccca caccaacatc tccgagagcc accccaatgc cactttcagc
 1381 gccgtgggtg agggcagcat ctgcgaggat gactggaatt ccggggagag gtctcacgtg
 1441 accgtgaccc acacagacct gccctcgcca ctgaagcaga ccattctccg gcccaagggg
 1501 gtggccctgc acaggcccgat tgtctacttg ctgccatcag ccggggagca gctgaacctg
 1561 cgggagctcg ccacatcac gtgcttggtg acgggtctct cctccgcgga cgtcttcgtg
 1621 cagtggatgc agagggggca gccctgtgct ccgggagaag atgtgaccag cgtcccaatg
 1681 cctgagcccc agggccccag cgggacttc gccacagca tcttgaccgt gtccgaagag
 1741 gaattggaaca cgggggagac ctacacctgc gtggtggccc atgaggcccc gcccaacagg
 1801 gtcaaccgaga ggaacctgga caagctccac gagggggagg tgagcgcga caggaggggc
 1861 tttagaagacc tgtggggcac cgcctccacc ttcactgccc tcttctctct gaggctcttc

FIGURA 7LL

```
1921 tacagtacca ccgtcacctt gttcaagggtg aaatgatccc aacagaagaa catcggagac
1981 cagagagagg aactcaaagg ggcgctgcct ccgggtctgg ggctctggcc tgcgtggcct
2041 gttggcacgt gttctctctc ccgcccggcc tccagttgtg tgccttcaca caggcttcct
2101 tctcgaccgg cagggggctgg ctggcttgca ggccacgagg tgggctctac cccacactgc
2161 ttctgctgtgt atacgcttgt tgccttgaaa taaatatgca cttttatcc atc
```

[SEC ID N.º: 61]

FIGURA 8A

HindIII SalI ClaI
 1 GAACTCGAGCAGCTGAAAGCTTTCATGTCCTCGAGTCCGACGGTATCGATAAGGATCCCTGAAAGCGAGCTTGATGTTAAAC
 81 ATCTACAAATTGGCTTTTCTTATCGACCATGACGTAAGCGCTTACGTTTGTGGACCTTGGAGAACTGGTAGCTG
 161 TTGTGGGCTGTGTCTCAAGATGATCAATTAATTTCCACCTTCCACCTACGATGGGGGCAATCCACCGGTGAGTAATAT
 241 TGTACGGCTAAGAGCGAATTTGGGCTGTAGGATCCCTGAAAGCGACGTTGGATGTTAAACATCTACAAATTGCCCTTTTCTT
 321 ATCGACCATGTACGTAAAGCGCTTACGTTTGTGGTGGACCTTGAAGAACTGGTAGCTGTGGGCTGTGTGTCTCAAG
 401 ATGGATCAATTAATTTCCACCTTCCACCTACGATGGGGGCAATCGACCGGTGATTAATATTGTACGGCTAAGAGCGAATTT
 481 GGCTGTAGGATCCCTGAAAGCGACGTTGATGTTAAACATCTACAAATTGCCCTTTTCTTATCGACCATGTAATGTAAGCGC
 561 TTACGTTTGTGGTGGACCTTGAAGAACTGGTAGCTGTGTGGGCTGTGGTCTCAAGATGGATCAATTAATTTCCACCT
 641 TCACCTACGATGGGGGCAATCGACCGGTGAGTAATATTGTACGGCTAAGAGCGAATTTGGGCTGTAGGATCCGCGAGCT
 721 GGTCAATCCCATTTCTTGAAGCAGCTCAACATGATCTCTTCTCGAGGAGATTTTTCAAATCAGTGCAGACAGCT
 801 GACGTAGTATCCGAGTCAGTTTATTTTCTACTAATTTGGTGGTTTATTTCCGGCTGTAGGACATGGCAACCGGGCG
 881 TGAATTTGGGGTATTTCTTCTATTTCCAACTTTTCTTGTATCCGACGCAATTAACGACTTTTGAATAGATACGCTGA
 961 CACGCCAAGCTCGCTAGTCAAAAGTGTACCAACAAACGCTTTACAGCAAGAACGGAATGGCGGTGACGCTCGCGGTGAC
 1041 GCCATTTCCGCTTTTTCAGAAATGGATAAATAGCTTGTCTCTATTTATCTTCCCAAAATTACCAATACATTACACTAGC
 ClaI
 1121 ATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACACCAAAATCGACTCTAGAGGATCTATCGATTTCCCGGTACCATGGGATCT
 MetGlySer
 SpeI
 1198 AAACCTTTTGTCTCTCTTTCATTTGTCATTTGTCATTTGTTTACATCTACTAGTTTG
 LysProPheLeuSerLeuLeuSerLeuSerLeuLeuLeuPheThrSerLeu
 1255 GCACAGACATCTGTGTCCCTCAAAAGTCATCTGCCCCGGGAGGCTCCGTG
 AlaGlnThrSerValSerProSerLysValIleLeuProArgGlyGlySerVal
 1309 CTGGTGACATGCAGCACCTCTGTGACCGCCCAAGTTGTGGGCATAGAGACCCCGTTG
 LeuValThrCysSerThrSerCysAspGlnProLysLeuLeuGlyIleGluThrProLeu
 1369 CCTAAAAGGAGTTGCTCTGCTGGGACACCGGAAGGTGTATGAACGACCAATGTG
 ProLysLysGluLeuLeuProGlyAsnAsnArgLysValTyroIleLeuSerAsnVal
 1429 CAAGAAGATAGCCCAACCAATGTGCTATTCAAACGCTCCCTGATGGCAGTCACAGCTAAA
 GlnGluAspSerGlnProMetCysTyrsrAsnCysProAspGlyGlnSerThrAlaLys
 1489 ACCTTCTCACCCTGTACTGGACTCCAGAACGGGTGGAACGTCACCCCTCCCTCTTTGG
 ThrPheLeuThrValTyrrpThrProLysValGluLeuAlaProLeuProSerTrp
 1549 CAGCCAGTGGCAAGAACCTTACCTACGCTGCGAGGTGGAGGTGGGACCCCGGGCC
 GlnProValGlyLysAsnLeuThrLeuArgCysGlnValGluGlyAlaProArgAla
 1609 AACCTCACCGTGGTGTCTCTCGTGGGAGAGGAGCTGAAACGGGAGCCAGCTGTGGGG
 AsnLeuThrValValLeuLeuArgGlyGlyLysGluLeuLysArgGluProAlaValGly

FIGURA 8A (Cont.)

1669 GAGCCCGCTGAGGTCAAGACACCGGTGCTGGTGGAGAGATCACCATCGAGCCCAATTC
 GluProAlaGluValThrThrValLeuValArgArgAspHisHisGlyAlaAsnPhe
 1729 TCGTCCCGCACTGAACCTGACCTCGCGCCCCAAGGCTGGAGCTGTTTGAGAACACCTCG
 SerCysArgThrGluLeuAspLeuArgProGlnGlyLeuGluLeuPheGluAsnThrSer
 1789 GCCCCTACCACTCCAGACCTTGTCTGCTGACGACCTCCCGACCAACTTGTGACGCCCC
 AlaProTyrGlnLeuGlnThrPheValLeuProAlaThrProProGlnLeuValSerPro
 1849 CGGTCCTAGAGGTGGACACCGACCGGACCGGTGCTGCTTCCCTGGACCGGCTGTTCCCA
 ArgValLeuGluValAspThrGlnGlyThrValValCysSerLeuAspGlyLeuPhePro
 1909 GTCTCGGAGGCCAGGTCCACCTGACCTGGACCTGGGACCGAGAGGTGAACCCACAGTCACC
 ValSerGluAlaGlnValHisLeuAlaLeuGlyAspGlnArgLeuAsnProThrValThr
 1969 TATGGCAACGACTCTTCTCGGCCAAGGCTCAGTCAGTGTGACCGCAGAGACGAGGGC
 TyrGlyAsnAspSerPheSerAlaValIleLeuGlyAsnGlnSerGlnGluThrLeuGlnThr
 2029 ACCCAGCGGCTGACGTGTGACGTAATCTGGGAAACAGAGCCAGGACACTGCAGACA
 ThrGlnArgLeuThrCysAlaValIleLeuGlyAsnGlnSerGlnGluThrLeuGlnThr
 2089 GTGACCATCTACAGCTTTCGGCGCCCCAAGTGTGACGAAAGCCAGAGGTCTCAGAA
 ValThrIleTyrSerPheProAlaProAsnValIleLeuThrLysProGluValSerGlu
 2149 GGGACCGAGGTGACAGTGAAGTGTGAGGCCACCTAGAGCCAAAGGTGACCGTGAATGG
 GlyThrGluValThrValLysCysGluAlaHisProArgAlaLysValThrLeuAsnGly
 2209 GTTCCAGCCCACTGGCGGCCGAGGGCCAGCTCTGCTGAAGGCCACCCAGAGGAC
 ValProAlaGlnProLeuGlyProArgAlaGlnLeuLeuLysAlaThrProGluAsp
 2269 AACGGCGCAGCTTCTCTGCTCTGCAACCTGGAGGTGGCGCCAGCTTATACACAAG
 AsnGlyArgSerPheSerCysSerAlaThrLeuGluValAlaGlyGlnLeuIleHisLys
 2329 AACCAGACCCGGAGCTTCGTGTCCTGATGCCCCGACCTGACGAGAGGATTTGTCCG
 AsnGlnThrArgGluLeuArgValLeuTyrGlyProArgLeuAspGluArgAspCysPro
 2389 GGAAACTGGACGTGGCCAGAAAATTCCAGCAGACTCCAATGTGCCAGGCTTGGGGGAC
 GlyAsnTrpThrTrpProGluAsnSerGlnGlnThrProMetCysGlnAlaTrpGlyAsn
 SacI
 2449 CCATTGCCCGAGCTCAAGTGTCTAAAGGATGGCAGCTTTCCTCCACTGCCCATCGGGGAATCA
 ProLeuProGluLeuLysCysLeuLysAspGlyThrPheProLeuProIleGlyGluSer
 2509 GTGACTGTCACTCGAGATCTTGAGGGCACCTACCTCTGTGCGGCCAGGACACTCAAGGG
 ValThrValThrArgAspLeuGluGlyThrTyrLeuCysArgAlaArgSerThrGlnGly
 SpeI SacI
 2569 GAGGTCACCCGCGAGGTGACCGTGAATGTGACTAGTGGGAGCTCAGCATCCCCCG
 GluValThrArgGluValThrValAsnValThrSerGlySerSerAlaSerPro
 2623 ACCAGCCCCAAGGTCTTCCGCTGAGCTCGACAGCACCCCCCAAGATGGGAACGTGGTC
 ThrSerProLysValPheProLeuSerLeuAspSerThrProGlnAspGlyAsnValVal

junEcoRI marker
3643 AAGGATGAACTTTAGAAATTCGATATCAAGCTAATTCGGATGCTTCCAACATTGGCAATAAAGTTTCTTAAGAT
LysAspGluLeu

2683	GTCCGATGCTGCTCCAGGGCTTCTTCCCCAGGAGCCACTCAGTGTGACCTGGAGCGAA
2743	VALAaCysLeuValGlnGlyPhePheProGlnGluProLeuSerValThrTrpSerGlu
2803	AGCGACAGAACTGACCGCCAGAAACTTCCACCTAGCCAGGATGCTCTCCGGGACCTG
2863	SerGlyGlnAsnValThrAlaArgAsnPheProProSerGlnAspAlaSerGlyAspLeu
2923	TACACACGAGCAGCCAGCTGACCTGCGGCCACACAGTGCACGACGCGCAAGTCCGTG
2983	TyrThrThrSerSerGlnLeuThrLeuProAlaThrGlnCysProAspGlyAspVal
3043	ACATGCCACGTGAAGCACTACACGAAATTCAGCCAGGATGTGACTGTGCCGAGTT
3103	ThrCysHisValLysHisTyrThrAsnSerSerGlnAspValThrValProCysArgVal
3163	CCCCACCTCCCATGCTGCCACCCCGACTGTGCTGCACCGACCGGCCCTCGAGGAC
3223	ProProProProCysCysHisProArgLeuSerLeuHisArgProAlaLeuGluAsp
3283	CTGCTCTTAGGTTACGAAGCGAACTCACGTGCACACTACCGGCTGAGAGATGCTCT
3343	LeuLeuLeuGlySerGluAlaAsnLeuThrCysThrLeuThrGlyLeuArgAspAlaSer
3403	GGTGCCACCTTCACCTGGAGCGCCCTCAAGTGGGAAAGACCTGTTCAGAGCACCTGAG
3463	GlyAlaThrPheThrTrpThrProSerSerGlyLysSerAlaValGlnGlyProProGlu
3523	CTTGACCTCTGTGGCTGTACAGCGTGTCCAGAGTACTTCTTGCTGTGCCAGGCCATG
3583	ArgAspLeuCysGlyCysTyrSerValSerArgValLeuProGlyCysAlaGlnProTrp
3643	AACCATGGGAGACCTTCACCTGCACCTGCCACCCCGAGTTGAAAGACCCCAACG
3703	AsnHisGlyGluThrPheThrCysThrAlaAlaHisProGluLeuLysThrProLeuThr
3763	GCCAAACATCACAAATCCGGAACACATTCGCGCCGAGGTCCACCTGTGTCGCCGCCG
3823	AlaAsnIleThrLysSerGlyAsnThrPheArgProGluValHisLeuLeuProProPro
3883	TCGGAGGAGCTGGCCCTGAACGAGCTGGTGAAGCTGACGTGCGTGGCAGTGGCTTCAGC
3943	SerGluGluLeuAlaLeuAsnGluLeuValThrLeuThrCysLeuAlaArgGlyPheSer
4003	CCCCAGGATGTGCTGTTCCCTGGCTGCAGGGGTACAGGAGCTGCCCGCGGAGAAGTAC
4063	ProLysAspValLeuValArgTrpLeuGlnGlySerGlnGluLeuProArgGluLysTyr.
4123	CTGACTTGGGCATCCCGCAGGAGCCAGCCAGGCGACCCACCTATGCTGTGACCCAGC
4183	LeuThrTrpAlaSerArgGlnGluProSerGlnGlyThrThrThrTyrAlaValThrSer
4243	ATACTGCGCTGGCAGCGCAGGACTGGAAGAGGGGGAGACCTTCTCTGCTGCTGGCGC
4303	IleLeuArgValAlaAlaGluAspTrpLysGlyGluThrPheSerCysMetValGly
4363	CACGAGGCCCTGCGCTGGCTTCACACAGAGACCATCGACCGCTTGGCGGDTAAACCC
4423	HisGluAlaLeuProLeuAlaPheThrGlnLysThrIleAspArgLeuAlaGlyLysPro
4483	ACCCATATCAATGTGTCTGTGTCTATGGCGGAGGCGGACCGCACCTGCTACAGATCTGAA
4543	ThrHisIleAsnValSerValValMetalGluAlaAspGlyThrCysTyrArgSerGlu
4603	junECORI marker
4663	AAGGATGAACCTTTAGAAATTCGATATCAAGCTAATTCCTCGATCGTTCAAACATTTGGCAAT
4723	LysAspGluLeu

98

3718 TGAATCCTGTTGCGGCTCTTGCGATGATATATCAATAAATTTCTGTTGAAATTACGTTAAGCATGTATAATTTAAACATGTAT

3719 TGCAATGACGTTATTTATGAGATGGTTTTTATATGATAGAGTCCCGCAATTATACATTTTAAATACCGGATAGAAACAAAAAT

3720 ATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTTATCGCGCGGTGTCACTATGTTACTAGATCGGGGATCTCGCGGTCTCCCTATAG

3721 TGAGTCGTATTAATTTTCGATAAGCCAGGTTAACTGCAATTAATGAAATCGGCCAAACGCGCGGGAGAGCGGTTTTTGCGGTAT

4038 TGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCACTGACTGCTGCTGCGTGGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATATCAGCTCACTCAAA

4118 AGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATAACGCGAGGAAGAAACATGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGG

4198 AACCGTAAAAAGGCGCGGTGCTGCGGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTCCGAGCATCACAAAAATCGACCGCTCAAG

4278 TCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAAGGTTTTCCCTCGGAAAGCTGGCGCTTTCTCAATGCTCAGCGTGTAGG

4358 CGACCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCTTCGGGAAGCTGGCGCTTTTCTCAATGCTCAGCGTGTAGG

4438 TATCTCAGTTTCGTTGATGTTGCTGCTCAAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCCGCTTTCAGCCGACCGCTGCGCTT

4518 ATCCGTTAACTATGCTCTTGAATCCAAACCGGTAAAGACACGACTTATTCGCCACTGGCAGCGCACTGGTAAACAGGATTA

4598 GCAGAGCGAGGATATGATAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGTGGCTTAACACTACGGCTACACTAGAAAGGACAGTATTT

4678 GGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGGAAAAGAGTTGTGAGTCTTTGATCCGGCAAAACAAACCCACCGCTGG

4758 TAGCGGTGTTTTTTGTTTGCAGCAGCAGATTAACGCGCAGAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCTTTGATCTTTTCTTA

4838 CGGGCTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTACGTTAAGGATTTTGGTCTATGAGATTATCAAAAGGATCTTTCACCTAG

4918 ATCTTTTAAATTAATAAATGAAATTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGATAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTT

4998 AATCAGTAGGCACTATCTCAGCATCTGTCTATTTTGTCTCATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTGGTTAGATAACTA

5078 CGATACGGGAGGCTTACCACTGCGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTACCGGCTCCAGATTTATCA

5158 GCAATAAACCGACCGACCGGAAGGCGCGAGCGCAGAAAGTGTCTCTGCAACTTTTATCGGCGCTCCATCCAGTCTATTAATG

5238 TTGCGGGGAAGCTAGAGTAAGTATGCTGCGCAAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCAATGCTACAGGATCGTGGTGT

5318 CACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCAATTCAGCTCCCGTTCCCAACGATCAAGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGTC

5398 AAAAAAGCGGTTAGCTCTTCCGTCCTCGATCGTTGTCAGNAGTAAGTTGGCGCGAGTTTATCACTCATGTTATATGTC

5478 AGCRCTGCATAAATCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCAATCT

5558 GAGAAATAGTGATATGCGCGCAGCAAGTTGCTCTTGGCCCGGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTA

5638 AAGTGCTCATATGGAAACCTTTCTTCCGGGGCAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCGATGTA

5718 ACCCACTGTCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACCTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAA

5798 ATGCGCAAAAAGGGAAATAGGGGACACGGAAATGTTGAAATACCTCATCTCTTCTTTTTCATAATATTTATGAAAGCATT

5878 TATCAGGGTTATTTGTCTCATAGCGGATACATATTTGAAATGATTTTAGAAAAATAAAACAATAGGGGTTCCCGCACATTT

5958 TCCCGGAAAGTGGCACTGACGCTTAAGAAACCATTTATATCATGACATTAACCTATAAACATAGAGCGGTATCACAGGCG

6038 CTTTTCGTCGCGGTTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACAGATGCACTCCCGGAGACGGTCAAGCTTGTGCTG

6118 TAAAGCGGATGCGCGGAGCAGACAAACCCGTACGGCGCGTCAAGCGGTTGTTGCGGCTGCTCGGGCTTAACTATGCT

6198 GGCAATCAGAGCAGATTTGTACTGAGAGTGCACCATATATGACATATTTGTCGTTAGAAAGCGGCTTACAATTAATACATAAACCTT

6278 TATGTATCATACATACGATACGATTTTAGGTGACACTATA

NdeI

FIGURA 8B
PÉPTIDO SEÑAL DE LEGÚMINA DE ALUBIA

MetSerLysProPheLeuSerLeuLeuSerLeuLeuPheThrSerThrCysLeuAla

[SEC ID N.º: 10]

FIGURA 8C **NUCLEÓTIDOS Y SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE PROTEÍNA** **REGIÓN DE CODIFICACIÓN DE pSHuJ**

```

1141 AGGATCTATCGATTCCGGGTACC ATG GAG AAC CAT TTG CTT TTC TGG GGA GTC CTG GCG
      met glu asn his leu leu phe phe trp gly val leu ala
1201/13 ATT AAG GCT GTT CAT GTG AAA GCC CAA GAA GAT GAA AGG ATT GTT CTT GTT GAC
      val phe ile lys ala val his val lys ala gln glu asp glu arg ile val leu val asp.
1261/33 TGT AAG TGT GCC CGG ATT ACT TCC AGG ATC ATC CGT TCT TCC GAA GAT CCT AAT
      asn lys cys ala arg ile thr ser arg ile ile arg ser ser glu asp pro asn
1321/53 GAG GAC ATT GTG GAG AGA AAC ATC CGA ATT ATT GTT CCT CTG AAC AGG GAG AAT ATC
      glu asp ile val glu arg asn ile arg ile ile val pro leu asn asn arg glu asn ile
1381/73 TCT GAT CCC ACC TCA CCA TTG AGA ACC AGA TTT GTG TAC CAT TTG TCT GAC CTC TGT AAA
      ser asp pro thr ser pro leu arg thr arg phe val tyr his leu ser asp leu cys lys
1441/93 AAA TGT GAT CCT ACA GAA GTG GAG CTG GAT AAT CAG ATA GTT ACT GCT ACC CAG AGC AAT
      lys cys asp pro thr glu val glu leu asp asn gln ile val thr ala thr gln ser asn
1501/113 ATC TGT GAT GAA GAC AGT GCT ACA GAG ACC TGC TAC ACT TAT GAC AGA AAC AAG TGC TAC
      ile cys asp glu asp eer ala thr glu thr cys tyr thr tyr asp arg asn lys cys tyr
1561/133 ACA GCT GTG GTC CCA CTC GTA TAT GGT GGT GAG ACC AAA ATG GTG GAA ACA GCC TTA ACC
      thr ala val val pro leu val tyr gly gly thr lys met val glu thr ala leu thr
1621/153 CCA GAT GCC TGC TAT CCT GAC TGA ATTC
      pro asp ala cys tyr pro asp

```

[SEC ID N.º: 11]

FIGURA 8D

NUCLEÓTIDOS Y SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE PROTEÍNA
REGIÓN DE CODIFICACIÓN DE pSHuSC

1137

GTCTGATCCCGGTACC ATG GTG CTC TTC GTG CTC ACC TGC
met val leu phe val leu thr cys

1178/9
CTG CTG GCG GTC TTC CCA GCC ATC TCC ACG AAG AGT CCC ATA TTT GGT CCC GAG GAG GTG
leu leu ala val phe pro ala ile ser thr lys ser pro ile phe gly pro glu glu val

1238/29
AAT AGT GTG GAA GGT AAC TCA GTG TCC ATC ACG TGC TAC TAC CCA CCC ACC TCT GTC AAC
asn ser val glu gly asn ser val ser ile thr cys tyr tyr pro pro thr ser val asn

1298/49
CGG CAC ACC CGG AAG TAC TGG TGC CGG CAG GGA GCT AGA GGT GGC TGC ATA ACC CTC ATC
arg his thr arg lys tyr trp cys arg gln gly ala arg gly gly cys ile thr leu ile

1358/69
TCC TCG GAG GGC TAC GTC TCC AGC AAA TAT GCA GGC AGG GCT AAC CTC ACC AAC TTC CCG
ser ser glu gly tyr val ser ser lys tyr ala gly arg ala asn leu thr asn phe pro

1418/89
GAG AAC GGC ACA TTT GTG GTG AAC ATT GCC CAG CTG AGC CAG GAT GAC TCC GGG CGC TAC
glu asn gly thr phe val val asn ile ala gln leu ser gln asp asp ser gly arg tyr

1478/109
AAG TGT GGC CTG GGC ATC AAT AGC CGA GGC CTG TCC TTT GAT GTC AGC CTG GAG GTC AGC
lys cys gly leu gly ile asn ser arg gly leu ser phe asp val ser leu glu val ser

1538/129
CAG GGT CCT GGG CTC CTA AAT GAC ACT AAA GTC TAC ACA GTG GAC CTG GGC AGA ACG GTG
gln gly pro gly leu leu asn asp thr lys val tyr thr val asp leu gly arg thr val

1598/149
ACC ATC AAC TGC CCT TTC AAG ACT GAG AAT GCT CAA AAG AGG AAG TCC TTG TAC AAG CAG
thr ile asn cys pro phe lys thr glu asn ala gln lys arg lys ser leu tyr lys gln

1658/169
ATA GGC CTG TAC CCT GTG CTG GTC ATC GAC TCC AGT GGT TAT GTG AAT CCC AAC TAT ACA
ile gly leu tyr pro val leu val ile asp ser ser gly tyr val asn pro asn tyr thr

1718/189
GGA AGA ATA CGC CTT GAT ATT CAG GGT ACT GGC CAG TTA CTG TTC AGC GTT GTC ATC AAC
gly arg ile arg leu asp ile gln gly thr gly gln leu leu phe ser val val ile asn

1778/209
CAA CTC AGG CTC AOC GAT GCT GGG CAG TAT CTC TGC CAG GCT GGG GAT GAT TCC AAT AGT
gln leu arg leu ser asp ala gly gln tyr leu cys gln ala gly asp asp ser asn ser

1838/229
AAT AAG AAG AAT GCT GAC CTC CAA GTG CTA AAG CCC GAG CCC GAG CTG GTT TAT GAA GAC
asn lys lys asn ala asp leu gln val leu lys pro glu pro glu leu val tyr glu asp

1898/249
CTG AGG GGC TCA GTG ACC TTC CAC TGT GCC CTG GGC CCT GAG GTG GCA AAC GTG GCC AAA
leu arg gly ser val thr phe his cys ala leu gly pro glu val ala asn val ala lys

1958/269
TTT CTG TGC CGA CAG AGC AGT GGG GAA AAC TGT GAC GTG GTC GTC AAC ACC CTG GGG AAG
phe leu cys arg gln ser ser gly glu asn cys asp val val val asn thr leu gly lys

2018/289
AGG GCC CCA GCC TTT GAG GGC AGG ATC CTG CTC AAC CCC CAG GAC AAG GAT GGC TCA TTC
arg ala pro ala phe glu gly arg ile leu leu asn pro gln asp lys asp gly ser phe

2078/309
AGT GTG GTG ATC ACA GGC CTG AGG AAG GAG GAT GCA GGG CGC TAC CTG TGT GGA GCC CAT
ser val val ile thr gly leu arg lys glu asp ala gly arg tyr leu cys gly ala his

2138/329
TCG GAT GGT CAG CTG CAG GAA GGC TCG CCT ATC CAG GCC TGG CAA CTC TTC GTC AAT GAG
ser asp gly gln leu gln glu gly ser pro ile gln ala trp gln leu phe val asn glu

2198/349
GAG TCC ACG ATT CCC CGC AGC CCC ACT GTG GTG AAG GGG GTG GCA GGA AGC TCT GTG GCC
glu ser thr ile pro arg ser pro thr val val lys gly val ala gly ser ser val ala

FIGURA 8D (Cont.)

2258/369

GTG CTC TGC CCC TAC AAC CGT AAG GAA AGC AAA AGC ATC AAG TAC TGG TGT CTC TGG GAA
val leu cys pro tyr asn arg lys glu ser lys ser ile lys tyr trp cys leu trp glu

2318/389

GGG GCC CAG AAT GGC CGC TGC CCC CTG CTG GTG GAC AGC GAG GGG TGG GTT AAG GCC CAG
gly ala gln asn gly arg cys pro leu leu val asp ser glu gly trp val lys ala gln

2378/409

TAC GAG GGC CGC CTC TCC CTG CTG GAG GAG CCA GGC AAC GGC ACC TTC ACT GTC ATC CTC
tyr glu gly arg leu ser leu leu glu glu pro gly asn gly thr phe thr val ile leu

2438/429

AAC CAG CTC ACC AGC CGG GAC GCC GGC TTC TAC TGG TGT CTG ACC AAC GGC GAT ACT CTC
asn gln leu thr ser arg asp ala gly phe tyr trp cys leu thr asn gly asp thr leu

2498/449

TGG AGG ACC ACC GTG GAG ATC AAG ATT ATC GAA GGA GAA CCA AAC CTC AAG GTT CCC GGG
trp arg thr thr val glu ile lys ile ile glu gly glu pro asn leu lys val pro gly

2558/469

AAT GTC ACG GCT GTG CTG GGA GAG ACT CTC AAG GTC CCC TGT CAC TTT CCA TGC AAA TTC
asn val thr ala val leu gly glu thr leu lys val pro cys his phe pro cys lys phe

2618/489

TCC TCG TAC GAG AAA TAC TGG TGC AAG TGG AAT AAC ACG GGC TGC CAG GCC CTG CCC AGC
ser ser tyr glu lys tyr trp cys lys trp asn asn thr gly cys gln ala leu pro ser

2678/509

CAA GAC GAA GGC CCC AGC AAG GCC TTC GTG AAC TGT GAC GAG AAC AGC CGG CTT GTC TCC
gln asp glu gly pro ser lys ala phe val asn cys asp glu asn ser arg leu val ser

2738/529

CTG ACC CTG AAC CTG GTG ACC AGG GCT GAT GAG GGC TGG TAC TGG TGT GGA GTG AAG CAG
leu thr leu asn leu val thr arg ala asp glu gly trp tyr trp cys gly val lys gln

2798/549

GGC CAC TTC TAT GGA GAG ACT GCA GCC GTC TAT GTG GCA GTT GAA GAG AGG AAG GCA GCG
gly his phe tyr gly glu thr ala ala val tyr val ala val glu glu arg lys ala ala

2858/569

GGG TCC CGC GAT GTC AGC CTA GCG AAG GCA GAC GCT GCT CCT GAT GAG AAG GTG CTA GAC
gly ser arg asp val ser leu ala lys ala asp ala ala pro asp glu lys val leu asp

2918/589

TCT GGT TTT CGG GAG ATT GAG AAC AAA GCC ATT CAG GAT CCC AGG CTT TTT GCA GAG TGA
ser gly phe arg glu ile glu asn lys ala ile gln asp pro arg leu phe ala glu

2978

ATTC

[SEC ID N.º: 12]

[illegible]

FIGURA 8E (Cont.)

2001 TAAAAATAATCAGATAACATCTAAACATGTAGATAAATAATAGTTGTTTCTATATCCAAACATGATGTCCAGAGCTTCACG
 2081 CTGCGGCAAGCATTCAAGGCGCAAGGCGTGTCTAAAGGAAGCGGAACACGTTAGAAAGCCAGTCCGCGAAGCCGGTGTGCTGAC
 2161 CCCGATGAATGCTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAAGGGAACACCAAGCCGANNAGAGAAAGCAGGTAGCTTGTGCACTGG
 2241 GCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGCGGTTTATATGGACAGCAAGCAACCGGAATTCGCCAGCTGGGCGCGCCCTCTGDTA
 2321 AGTTGGGAGCCCTCAAAAGTAACTGGATGGCTTCTTCCGCCCAAGGATCTGATGGCGAGGGATCAAGATCATGA
 2401 GCGAGAAATTAAGGAGTCACGTTATGACCCCGCGGATGAGCGGGACAAGCCGTTTACGTTTGGAACTGACAGAACCC
 2481 GCAACGTTNAGGAGCCACTCAGCCGCGGTTTCTGGAGTTTAATGAGCTAAAGCACAATACGTACAGAAACCATTTATTGCGC
 2561 GTTCAAAAGTCGCTTAAGGTCACTATCAGCTAGCAAAATATTCTTGTCAAAATGCTCCACTGACGTTCCATAAATTCCC
 2641 CTCGGTATCCAAATTAGAGTCTCATATTCACTCTCAATCCAGATCTGGATCGTTTCCCATGATTGAACAAGATGGATTGCA
 MetilegluGlnAspGlyLeuHi
 2721 CQCAGGTTCTCGGCGCTTGGTGGAGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCGG
 eAlaGlySerProAlaAlaTrpValGluArgLeuPheGlyTyrAspTrpAlaGlnGlnThrIleGlyCysSerAspAlaA
 2801 CCGTGTTCGGGCTGTCAGCCAGGCGGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCCAGCTGTCTCGGTGCCCTGAATGAAATGTCAG
 laValPheArgLeuSerAlaGlnGlyArgProValLysThrAspLeuSerGlyAlaLeuAsnGluLeuGln
 2881 QACGAGCGCAGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGCGGCTTCTTGGCAGCTGTGCTCAGCTGTTGTCACACTGAAGCGGG
 AspGluAlaAlaArgLeuSerTrpLeuAlaThrTrpGlyValProCysAlaAlaValLeuAspValValThrGluAlaAl
 2961 AAGGACTGGCTGCTATTGGCGGAGTCCGCGGCGAGGATCTCTGTCATCTCACTCTGCTCCGCGGAAAGTATCCCA
 YArgAspTrpLeuLeuGlyGluValProGlyGlnAspLeuSerSerHisLeuAlaProAlaGluValValSerI
 3041 TCATGGCTGATGCAATCGCGCGCTGCTCATACGCTTGTATCGGCTACCTGCGCATCCAGCCAGCGAAACATCGCATC
 leMetAlaAspAlaMetArgArgLeuHisThrLeuAspProAlaThrCysProPheAspHisGlnAlaLysHisArgIle
 3121 GAGCGAGCACGTTACTCGGATGGAAGCCGGCTTGTGCTGATCAGGATGATCTGGACGAAAGCATCAGGGGCTCGCGCCACG
 GluArgAlaArgThrArgMetGluAlaGlyLeuValAspGlnAspLeuAspGluGluHisGlnGlyLeuAlaProAl
 3201 CGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGCGCGCATGCCGAGCGATGATCTCGTCTGACCCCATGGCGATGCTCTGCTGCGA
 adluLeuPheAlaArgLeuLysAlaArgMetProAspGlyAspAspLeuValValThrHisGlyAspAlaCysLeuProA
 3281 ATATCATGGTGGAAATGCGCGCTTTCTGATTCATGCTGCTGGCGGCTGGGCTGGGCTATTCAGGACATATA
 enIleMetValGluAsnGlyArgPheSerGlyPheIleAspCysGlyArgLeuGlyValAlaAspArgTyrGlnAspIle
 3361 GCGTTGGCTACCGCTGATATTGCTGAGAGGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCCGCTCTGCTGCTTTTACGGTATCGCGG
 AlaLeuAlaThrArgAspIleAlaGluGluLeuGlyGlyGluTrpAlaAspArgPheLeuValLeuTyrGlyIleAlaAl
 BamHI
 3441 TCCCGATTCCGAGCGCATCGCCCTTCTATGCGCTTCTTGTAGAGTTCTTCTGAGCGGAGTCTGTAGGATCCCCCGGATGAGC
 aProAspSerGlnArgIleAlaPheTyrArgLeuLeuAspGluPhePhe...
 3521 TAAGCTAGCTATATCATCAATTTATGTATTACACATATATCGCAGCTCAGTCTTTCATCTACGGCAATGTACCAGCTGAT
 3601 ATAATCAGTTATTGAATATTTCTGAAATTTAACTTGCATCAATAAATTTATGTTTTGCTTGGAGCTATAATACCTGACT
 3681 TGTTATTTTATCAATAAATTTTAACTATATTTCTTTCAAGATGGGAATTAATTCACATGGCGGCTGTTTTTACAAACGTG
 3761 TGAAGGAAAACCCCTGCGCTTACCACCACTTAATCGCTTCCAGCAGCATCCCGCTTTCCGCGAGCTGGCGGTAATAGCGAAG
 PvuI
 3841 AGGCGCGCACCGATGCGCTTCCCAACAGTTGCGGAGCTGAAATGGCGCCGCGTCTTTTCGCTTTCTTCGCTTCTTCT
 3921 GCGCACGTTCCGCGGCTTTCCCGGCTCAAGGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTTTAGGGTTCCGATTTTAGTGCTTTACGGCACC

FIGURA 8E (Cont.)

4001 TCGACCCCAAAACCTTGATTTGGGTGATGTTCACTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACG
4081 TTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGA CTCTTGTTCCAAACTGGAAACAACACTCAACCTATCTCGGGCTATTCTTTTGA
4161 TTTATAAGGGAATTTTGCCGATTTTCGGAAACCAACCATCAAAACAGGATTTTCGCCCTGCTGGGGCAAAACAGCGTGGACCGCTT
4241 GCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAACCAACCCCAAG
4321 TACATTAAAAACGTCCGCAATGTGTTATTAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCAATAATATATCTCTGCCACCCAGC
4401 CAGCCAACAGCTCCCCGACCCGGCAGCTCGGCACAAAATCACCACTCGATACAGGCAGGCCCATCAG

[SEC ID N.º: 13]

FIGURA 8F pBMSP-lspJSC

```

1  CTGATGGGCTGCCTGTATCGAGTGGTGATTTTGTGCGAGCTGCCGTTCGGGAGCTGTTGGCTGGCTGGTCAGGATA
81  TATTGTGGTGTAAACAAATTGACCGTTAGACAACTTAATAACACATTTCGGACGTTTTTAATGTACTGGGGTGGTTTTTTC
161  TTTTCACCAAGTACAGCGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTG
241  GTTTGCCCCAGCAGCGCAAAATCCTGTGTTGATGTTGATGTTCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAAATAGCCC
321  GAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACRAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGGAAA
401  AACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTTGGGGTCAAGGTGCCGTAAAGCAC
481  TAAATCGGAACCTTAAGGGAGGCCCGGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCAACGTGCGGAGAAAGGAGGGAAG

      . Sfo I
561  AAAGCGAAAGGAGCGGGCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGCGCATCGGTGCGGGCCCTCTTCGCTATTACGCC
641  AGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGCGGATTAAGTTGGTTAACGCCAGGGTTTTTCCAGTCACGACGTTGTTAAAACG

      Xmn I
721  ACGGCCAGTGAATTAATTCCTTGAAGAAATATAGTTTAAATATTTATTGATAAAATAACAAGTCAGGTATTATATAG

      Xmn I
801  TCCAAGCRAAACAATAATTTATTGATGCAAGTTTAAATTCAGAAATATTTCAATAACTGATTATATCAGCTCGTACATT
881  GCCGTAGATGAAGACTGAGTGGATATTATGTTGTAATACATAAATTGATGATATAGCTAGCTTAGCTCATCGGGGATC
961  CTCAGAGTCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAAGGCGATAGAGGCGATGCGCTGCAATCGGGAGCGCGGATACCGTAA

      ***PhePheGluAspLeuArgTyrPheAlaIleArgGlnSerAspProAlaAlaIleGlyTyrL
1041  AGCACGAGGAAGCGGTACGCCCATTCGCCCGCCAAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAAACGCTATGTCTGATAGCG
     euValLeuPheArgAspAlaTrpGluGlyGlyLeuGluGluAlaIleAspArgThrAlaLeuAlaIleAspGlnTyrArg
1121  GTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGCGCAT
     AspAlaValGlyLeuArgGlyCysAspIlePheGlySerPheArgGlyAsnGluValMetIleAsnProLeuCysAlaAs
1201  CGCCATGGGTCACGACGAGATCATCGCCGTCCGGCATGCGCCCTTGAGCCTGGCGAACACAGTTCCGGCTGGCGCGAGCCCC
     pGlyHisThrValValLeuAspAspGlyAspProMetArgAlaLysLeuArgAlaPheLeuGluAlaProAlaLeuGlyG
1281  TGATGCTCTTCGTCACAGATCATCTCTGATCGACAAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGC
     InHisGluGluAspLeuAspAspGlnAspValLeuGlyAlaGluMetArgThrArgAlaArgGluIleArgHisLysAla
1361  TTGGTGGTCAATGGGCAGGTAGCCCGATCAAGCGTATGACGCCCGCATTCGATTCAGCCATGATGGATACCTTTCTCGG
     GlnHisAspPheProCysThrAlaProAspLeuThrHisLeuArgArgMetAlaAspAlaMetIleSerValLysGluAl

```

107

FIGURA 8F (Cont.)

3201 TGGGCCCTGTGGTCTCAAGATGGATCAATTAATTTCCACCTTCCACCTACGATGGGGGGCATCGCACCGGTGAGTAATATTGT
 3281 ACGGCTAAGAGCGAATTTGGCTGTAGGATCGCGAGCTGGTCAATCCCATTTGCTTTTGAAGCAGCTCAACATTTGATCTC
 3361 TTTCTCGATCGAGGGAGATTTTCAAAATCAGTGCAGAACACGTGACGTAAAGTATCCGAGTCAGTTTATTTTCTACTA
 3441 ATTTGGTCTGTTTATTTTCGGCGTGTAGGACATGGCAACCGGGCTGAATTTTCGGGTATTCTGTCTTCTATTCCACCTTTT
 3521 TCTTGATCCGACGCCATTAAACGACTTTTGAATAGATACGCTGACACGCAAGCCTCGCTAGTCAAAAGTGTACCAACAA
 3601 CGCTTTACAGCAAGAACGGAATGCGCGTACGCTCGCGGTGACGCCATTTTCGCCCTTTTCAGAAATGGATATAGCCTTG
 3681 CTTCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATATACACTAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCTCGATACACCAAAATCG
 KpnI
 3761 ACTCTAGGGGTACCATGGTGTCTTTCGTGCTCACCTGCTGCTGGCGGTCTTCCACGCCATC
 MetValLeuPheValLeuThrCysLeuLeuAlaValPheProAlaIle
 3821 TCCACGAAAGATCCCATATTTGGTCCCGAGGAGGTGAATAGTGTGAAGGTAACTCAGTG
 SerThrLysSerProIlePheGlyProGluValAlaSerValGluGlyAsnSerVal
 3881 TCCATCACGTGCTACTACCCACCCCTCTGTCAACCGGCACACCCCGAAGTACTGCTGC
 SerIleThrCysTyrTyrProThrSerValAsnArgHisThrArgLysTyrTrpCys
 3941 CGGCAGGAGCTAGAGGTGGCTGCATAACCTCATCTCTCGAGGGCTACGTCTCCAGC
 ArgGlnGlyAlaArgGlyGlyCysIleThrLeuIleSerSerGluGlyTyrValSerSer
 4001 AAATATGCAGGAGGCTAACCTCACCACTTCCCGAGAACCGCACATTTGTGTGAAC
 LysTyrAlaGlyArgAlaAsnLeuThrAsnPheProGluAsnGlyThrPheValValAsn
 4061 ATTGCCAGCTGAGCCAGGATGACTCCGGCGCTACAAGTGTGGCTGGGCATCAATAGC
 IleAlaGlnLeuSerGlnAspAspSerGlyArgTyrLysCysGlyLeuGlyIleAsnSer
 4121 CGAGGCTGTCTTGTATGTTCAGCTGGAGGTGAGCCAGGGTCTTGGGCTCCTAAATGAC
 ArgGlyLeuSerPheAspValSerLeuGluValSerGlnGlyProGlyLeuLeuAsnAsp
 4181 ACTAAAGTCTACACAGTGGACCTGGGCAGAACGGTGACCATCAACTGCCCTTTTCRAGACT
 ThrLysValTyrThrValAspLeuGlyArgThrValThrIleAsnCysProPheLysThr
 4241 GAGAATGCTCAAAAGAGGAAGTCTTGTACAGCAGATAGGCTGTACCTGTGTGCTGCTC
 GluAsnAlaGlnLysArgLysSerLeuTyrLysGlnIleGlyLeuTyrProValLeuVal
 4301 ATCGACTCCAGTGGTTATGTGAATCCCACTATACAGGAQAATACGCCCTTGATATTACG
 IleAspSerSerGlyTyrValAsnProAsnTyrThrGlyArgIleArgLeuAspIleGln
 4361 GGTAAGTGGCCAGTTACTGTTTCAGCGTTGTTCATCAACCACTCAGGCTCAGCGATGCTGGG
 GlyThrGlyGlnLeuLeuPheSerValIleAsnGlnLeuArgLeuSerAspAlaGly
 4421 CAGTATCTCTGCCAGGCTGGGATGATTCCAATAGTAATAAGAAQAATGCTGACCTCCAA
 GlnTyrLeuCysGlnAlaGlyAspAspSerAsnSerAsnLysLysAsnAlaAspLeuGln

FIGURA 8F (Cont.)

4483 GTGCTAAAGCCCGAGCCGAGCTGGTTTATGAAGACCTGAGGGGCTCAGTGACCTTCCAC
 ValLeuLysProGluProGluLeuValTyrGluAspLeuArgGlySerValThrPheHis
 4543 TGTGCCCTGGCCCTAGGTGGCAACCGTGGCCAAATTTCTGTGCGACACAGACAGTGGG
 CysAlaLeuGlyProGluValAlaAsnValAlaLysPheLeuCysArgGlnSerSerGly
 4603 GAAAACTGTGACGTGTCGTCAACACCCCTGGGGAAGAGGGCCCCAGCCTTTTADGGCAGG
 GluAsnCysAspValValAlaAsnThrLeuGlyLysArgAlaProAlaPheGluGlyArg
 4663 ATCTGTCTCAACCCCAAGACAGGATGGCTCATTCAGTGTGGTGTATCACAGGCCTGAGG
 IleLeuLeuAsnProGlnAspLysAspGlySerPheSerValValIleThrGlyLeuArg
 4723 AAGGAGGATGCAGGGCGCTACCTGTGTGTGAGCCCATTCGGATGTGTGAGCTGCAGGGAAGGC
 LysGluAspAlaGlyArgTyrLeuCysGlyAlaHisSerAspGlyGlnLeuGlnGluGly
 4783 TCGCCTATCCAGGCCCTGGCAACTCTTCGTCAATGAGGAGTCCACGATTCGCCCGCAGCCCC
 SerProIleGlnAlaTrpGlnLeuPheValAsnGluGluSerThrIleProArgSerPro
 4843 ACTGTGTGAAGGGGTGGCAGGAAGCTCTGTGGCCGTGTCTGCTGCCCTACAAACCGTAAG
 ThrValValLysGlyValAlaGlySerSerValAlaValLeuCysProTyrAsnArgLys
 4903 GAAAGCAAAAGCATCAAGTACTGTGTGTCTCTGGGAGGGGCCAGAAATGGCCGCTGCCCC
 GluSerLysSerIleLysTyrTrpCysLeuTrpGluGlyAlaGlnAsnGlyArgCysPro
 4963 CTGCTGGTGGACAGCGGGGTGGTTAAAGGCCCACTACGAGGGCCGCTCTCCCTGCTG
 LeuLeuValAspSerGluGlyTrpValLysAlaGlnTyrGluGlyArgLeuSerLeuLeu
 5023 GAGGAGCCAGCCACCGCACCTTCACCTGTCTCATCTCAACCAGCTCACCGCGGACGCC
 GluGluProGlyAsnGlyThrPheThrValIleLeuAsnGlnLeuThrSerArgAspAla
 5083 GGCTTCTACTGTGTCTGACCAACGGCGATACTCTCTGGAGGACCCCGTGGAGATCAAG
 GlyPheTyrTrpCysLeuThrAsnGlyAspThrLeuTrpArgThrThrValGluIleLys
 5143 ATTATCGAAGGAGAACCAACCTCAAGGTTCCCGGGAATGTACGGGCTGTGTGGGAGAG
 IleIleGluGlyGluProAsnLeuLysValProGlyAsnValThrAlaValLeuGlyGlu
 5203 ACTCTCAAGGTCCCTGTCACTTTCCATGCAAAATCTCTCCTACGAGAAATACTGCTGC
 ThrLeuLysValProCysHisPheProCysLysPheSerSerTyrGluLysTyrTrpCys
 5263 AAGTGGAATAACACGGGCTGCCAGGCCCTGCCCAAGACGAAAGGCCCAAGAGGCC
 LysTrpAsnAsnThrGlyCysGlnAlaLeuProSerGlnAspGluGlyProSerLysAla
 5323 TTCGTGAACCTGTGACGAGAACACCGCGCTTGTCTCCCTGACCCCTGAACTGTGTAACCCAGG
 PheValAsnCysAspGluAsnSerArgLeuValSerLeuThrLeuAsnLeuValThrArg
 5383 GCTGATGAGGGCTGGTACTGTGTGTGAGTGAAAGCAGGGCCACTTCTTATGAGAGACTGCA
 AlaAspGluGlyTrpTyrTrpCysGlyValLysGlnGlyHisPheTyrGlyGluThrAla

5443 QCCGTCTATGTGGCAATTGAAAGAGAGGAGCGCAGCGGGGTCCCGCATGTCAGCGCCTAGCG
AlaValTyrValAlaValGluGluValArgLybAlaAlaGlySerArgbValSerLeuAla
5503 AAGGCAGACGCTGCTCTGATGAGAAAGGTGCTAGACTCTGGTCTTTTCGGGAGATTTGAGAAC
LybAlaAspAlaAlaProAspGluLysValLeuAspSerGlyPheArgGluIleGluAsn
EcoRI
5563 AAAGCCATTCCAGGATCCAGGCTTTTTCGAGAGTGAATTCCCGATCGTTCAAAACAATTTGGCAATAAAG
LybAlaIleGluAspProArgLeuPheAlaGlu
5631 TTTCCTTAAGATTTGAATCCGTGTGCGGTCTTGCGATGATTAATATATATTTCTGTGAATTACGTTAAAGCATGTAATAA
5711 TTAAACATGTAATGACATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATA
5791 GAAACAAATAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGATCCCGTCGA
ClaI
5871 CGGTATCGATAAGGATCCCTGAAAGCGACGTTGGATGTTTAAACATCTACAATAATGCCCTTTCTTATCGACCATGTACGTAA
5951 GCGCTACGTTTTTGTGGACCTTGAGGAACACTGCTAGCTGTTGTGGCCCTGTGCTCAAGATGATATCAATTAATTTCC
6031 ACCTTACCTACGATGGGGGCATCGCACCGTGAGTAATATGTCAGGCTAAGAGCGAATTTTGCCCTGTAGGATCCCTG
6111 AAAGCAAGTTGGATGTTAACATCTACAATAATGCCCTTTCTTATCGACCATGTACGTAAAGCGCTTACGTTTTTGGTGGAC
6191 CCTTGAGGAACAATGCTGTAGCTGTTGTGGCCCTGTGCTCAAGATGGATCAATTAATTTCCACCTTACCTACCATGCGGGGG
6271 CATCGCACCGGTGAGTAATATTTGACGGCTAAGAGCGAATTTTGCCCTGTAGGATCCCTGAAAGCGACGTGTGATGTTAAAC
6351 ATCTACAATAATGCCCTTTCTTATCGACCATGTACGTAAAGCGCTTACGTTTTTGGTGGACCCCTTGAGGAACAATGCTGGTAGCTG
6431 TTGTGGGCCCTGTGCTCAAGATGGATCAATTAATTTTCCACCTTACCATGATGGGGGCGATCGCACCGGTGAGTAATAT
6511 TGTACGGCTAAGAGCGAATTTGCGCCTGTAGGATCCGCGAGCTGTGTCATCCCATGCTTTTGAAGCAGCTCAACAATTGAT
XhoI
6591 CTCCTTCTCGAGGGAGATTTTTCAAATCAGTGGCGCAAGACGTGACGTAAGTATCCGAGTCAGTTTTTATTTTCTACTAA
6671 TTTGGTCTGTTTATTTTCGGCGTGTAGGACATGGCAACCGGGCCGTAAATTTTCGGGGTATTTCTGTCTATTTCCAACTTTT
6751 CTTGATCCGCGAGCCATTAAAGCACTTTTGAATAGATACGCTGACACGCCCAAGCCCTCGCTAGTCAAAAGTGTACCAACAAC
6831 GCCTTACAGCAAGAACGGATGTCGGGTGACGCTCGGGGTGACGCCCATTTTCGCCCTTTTCAGAAATGATTAATAGCCTTTC
6911 TTCCTATTATATCTTCCCAATATTACCAATACATTTACACTAGCATCTGAAATTTTCATAACCAATCTCGATACACCAAAATCGA
XbaI
6991 CTCCTAGAGGATCTAACCATGGGATCTAAACCTTTTTTTGTCTCTTCTTTTCATTGTCATTGCTT
MetGlySerIysProPheLeuSerLeuLeuSerLeuSerLeuLeu
SpeI
7053 TTGTTTACATCTACTAGTTTGGCACAAAGAGATGAAGGATTTGTTCTTTGTTGACACAAA
LeuPheThrSerThrSerLeuAlaGlnGluAspGluArgIleValLeuValAspAsnLys

FIGURA 8F (Cont.)

```

7113 TGTAAAGTGTGCCCGATTACTTCCAGGATCATCCGTTCTTCCGAAGATCCTAATAGGAC
    CysLysCysAlaArgIleThrSerArgIlelleArgSerSerGluAspProAsnGluAsp
7173 ATTGTGGAGAGAAACATCCGAATTATTGTTCTCTGAACAACAGGGAGAAATATCTCTGAT
    IleValGluArgAsnIleArgIlelleValProLeuAsnAsnArgGluAsnIleSerAsp
7233 CCCACCTCACCAATTGAGAACCCAGATTGTTGTGTACCATTTGTTCTGACCTCTGTAAAAAATGT
    ProThrSerProLeuArgThrArgPheValTyrHisLeuSerAspLeuCysLysLysCys
7293 GATCCTACAGAACTGGAGCTGGATAATCAGATAGTTACTGCTACCCAGAGCAATATCTGT
    AspProThrGluValGluLeuAspAsnGlnIleValThrAlaThrGlnSerAsnIleCys
7353 GATGAAGACAGTGTCTACAGAGACCCTGCTACACTTATGACAGAAACAAGTGCTACACAGCT
    AspGluAspSerAlaThrGluThrCysTyrThrTyrAspArgAsnLysCysTyrThrAla
7413 GTGTGCCCACTCGTATATGGTGGTGAGACCACAAATGUGTGGAAACAGCCTTTAACCCCCAGAT
    ValValProLeuValTyrGlyGlyGluThrLysMetValGluThrAlaLeuThrProAsp
    SacI
7473 GCCTGCTATCCTGACTGAGCTCGAATTTCGCCGATCGTTCAAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAAAT
    AlaCysTyrProAsp...
7547 CCTGTTGCCGGTCTTCCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTATAATAATTACATGTAAATGCAT
7627 GACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGGATAGAAACAACAAAATATAGC
7707 GCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCTATGTTACTAGATCGGGAAATTAAATTCAGATCGGCTGAGTGGCT
7787 CCTTCAATCGTTGCGGTTCTGTCTAGTTCCAAACGTAACCGGCTGTCCCGCGGTCTATCGGGCGGTGCATAACCGTGACTC
7867 CCTTAATTTCCGCTCATGATCAGATTGTGTTCCCGGCTTCAGTTTAAACTATCAGTGTTTTGACAGGATATATTTGGCG
7947 GGTAAACCTAAGAGAAAGAGCGTTTATTAGAATAATCGGATATTTAAAGGGCGTGAAAGGTTTATCCGTTCCGTCCAT
    BglII Sfo I
8027 TTGTATGTGATGCCAACCCACAGGTTTCCCCAGATCTGGCGCGCGGCCAG

```

[SEC ID N.º: 14]

FIGURA 9

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PLANET BIOTECHNOLOGY, INCORPORATED
Larrick, James William
Wycoff, Keith Lynn

<120> NOVEL IMMUNOADHESION FOR THE PREVENTION OF RHINOVIRUS INFECTION

<130> 030905.0003.WO

<140> Pendiente de asignación

<141> 2001-04-27

<150> 60/200, 298

<151> 2000-04-27

<160> 8

<170> FastSEO para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 1596

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (1596)

<223> ICAM-1

```

<400> 1
atg gct ccc agc agc ccc egg ccc ggg ctg ccc gea ctg ctg gtc ctg      48
Met Ala Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ala Leu Pro Ala Leu Leu Val Leu
1          5          10          15

ctc ggg gct ctg ttc cca gga cct ggc aat gcc cag aca tct gtg tcc      96
Leu Gly Ala Leu Phe Pro Gly Pro Gly Asn Ala Gln Thr Ser Val Ser
20          25          30

ccc tca aaa gtc atc ctg ccc egg gga ggc tcc gtg ctg gtg aca tgc     144
Pro Ser Lys Val Ile Leu Pro Arg Gly Gly Ser Val Leu Val Thr Cys
35          40          45

agc acc tcc tgt gac cag ccc aag ttg ttg ggc ata gag acc ccg ttg     192
Ser Thr Ser Cys Asp Gln Pro Lys Leu Leu Gly Ile Glu Thr Pro Leu
50          55          60

cct aaa aag gag ttg ctc ctg cct ggg aac aac cgg aag gtg tat gaa     240
Pro Lys Lys Glu Leu Leu Leu Pro Gly Asn Asn Arg Lys Val Tyr Glu
65          70          75          80

```

FIGURA 9 (Cont.)

ctg agc aat gtg caa gaa gat agc caa cca atg tgc tat tca aac tgc	288
Leu Ser Asn Val Gln Glu Asp Ser Gln Pro Met Cys Tyr Ser Asn Cys	
85 90 95	
cct gat ggg cag tca aca gct aaa acc ttc ctc acc gtg tac tgg act	336
Pro Asp Gly Gln Ser Thr Ala Lys Thr Phe Leu Thr Val Tyr Trp Thr	
100 105 110	
cca gaa cgg gtg gaa ctg gca ccc ctc ccc tct tgg cag cca gtg ggc	384
Pro Glu Arg Val Glu Leu Ala Pro Leu Pro Ser Trp Gln Pro Val Gly	
115 120 125	
aag aac ctt acc cta cgc tgc cag gtg gag ggt ggg gca ccc cgg gcc	432
Lys Asn Leu Thr Leu Arg Cys Gln Val Glu Gly Gly Ala Pro Arg Ala	
130 135 140	
aac ctc acc gtg gtg ctg ctc cgt ggg gag aag gag ctg aaa cgg gag	480
Asn Leu Thr Val Val Leu Leu Arg Gly Glu Lys Glu Leu Lys Arg Glu	
145 150 155 160	
cca gct gtg ggg gag ccc gct gag gtc acg acc acg gtg ctg gtg agg	528
Pro Ala Val Gly Glu Pro Ala Glu Val Thr Thr Thr Val Leu Val Arg	
165 170 175	
aga gat cac cat gga gcc aat ttc tgc tgc cgc act gaa ctg gac ctg	576
Arg Asp His His Gly Ala Asn Phe Ser Cys Arg Thr Glu Leu Asp Leu	
180 185 190	
cgg ccc caa ggg ctg gag ctg ttt gag aac acc tgc gcc ccc tac cag	624
Arg Pro Gln Gly Leu Glu Leu Phe Glu Asn Thr Ser Ala Pro Tyr Gln	
195 200 205	
ctc cag acc ttt gtc ctg cca gcg act ccc tca caa ctt gtc agc ccc	672
Leu Gln Thr Phe Val Leu Pro Ala Thr Pro Pro Gln Leu Val Ser Pro	
210 215 220	
cgg gtc cta gag gtg gac acg cag ggg acc gtg gtc tgt tcc ctg gac	720
Arg Val Leu Glu Val Asp Thr Gln Gly Thr Val Val Cys Ser Leu Asp	
225 230 235 240	
ggg ctg ttc cca gtc tgc gag gcc cag gtc cac ctg gca ctg ggg gac	768
Gly Leu Phe Pro Val Ser Glu Ala Gln Val His Leu Ala Leu Gly Asp	
245 250 255	
cag agg ttg aac ccc aca gtc acc tat ggc aac gac tcc ttc tgc gcc	816
Gln Arg Leu Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Asn Asp Ser Phe Ser Ala	
260 265 270	
aag gcc tca gtc agt gtg acc gca gag gac gag ggc acc cag cgg ctg	864
Lys Ala Ser Val Ser Val Thr Ala Glu Asp Glu Gly Thr Gln Arg Leu	
275 280 285	
acg tgt gca gta ata ctg ggg aac cag agc cag gag aca ctg cag aca	912
Thr Cys Ala Val Ile Leu Gly Asn Gln Ser Gln Glu Thr Leu Gln Thr	
290 295 300	
gtg acc atc tac agc ttt ccg gcg ccc aac gtg att ctg acg aag cca	960
Val Thr Ile Tyr Ser Phe Pro Ala Pro Asn Val Ile Leu Thr Lys Pro	
305 310 315 320	

FIGURA 9 (Cont.)

gag gtc tca gaa ggg acc gag gtg aca gtg aag tgt gag gcc cac cct	1008
Glu Val Ser Glu Gly Thr Glu Val Thr Val Lys Cys Glu Ala His Pro	
325 330 335	
aga gcc aag gtg acg ctg aat ggg gtt cca gcc cag cca ctg ggc ccg	1056
Arg Ala Lys Val Thr Leu Asn Gly Val Pro Ala Gln Pro Leu Gly Pro	
340 345 350	
agg gcc cag ctc ctg ctg aag gcc acc cca gag gac aac ggg cgc agc	1104
Arg Ala Gln Leu Leu Leu Lys Ala Thr Pro Glu Asp Asn Gly Arg Ser	
355 360 365	
ttc tcc tgc tct gca acc ctg gag gtg gcc ggc cag ctt ata cac aag	1152
Phe Ser Cys Ser Ala Thr Leu Glu Val Ala Gly Gln Leu Ile His Lys	
370 375 380	
aac cag acc cgg gag ctt cgt gtc ctg tat ggc ccc cga ctg gac gag	1200
Asn Gln Thr Arg Glu Leu Arg Val Leu Tyr Gly Pro Arg Leu Asp Glu	
385 390 395 400	
agg gat tgt ccg gga aac tgg acg tgg cca gaa aat tcc cag cag act	1248
Arg Asp Cys Pro Gly Asn Trp Thr Trp Pro Glu Asn Ser Gln Gln Thr	
405 410 415	
cca atg tgc cag gct tgg ggg aac cca ttg ccc gag ctc aag tgt cta	1296
Pro Met Cys Gln Ala Trp Gly Asn Pro Leu Pro Glu Leu Lys Cys Leu	
420 425 430	
aag gat ggc act ttc cca ctg ccc atc ggg gaa tca gtg act gtc act	1344
Lys Asp Gly Thr Phe Pro Leu Pro Ile Gly Glu Ser Val Thr Val Thr	
435 440 445	
cga gat ctt gag ggc acc tac ctc tgt cgg gcc agg agc act caa ggg	1392
Arg Asp Leu Glu Gly Thr Tyr Leu Cys Arg Ala Arg Ser Thr Gln Gly	
450 455 460	
gag gtc acc cgc aag gtg acc gtg aat gtg ctc tcc ccc cgg tat gag	1440
Glu Val Thr Arg Lys Val Thr Val Asn Val Leu Ser Pro Arg Tyr Glu	
465 470 475 480	
att gtc atc atc act gtg gta gca gcc gca gtc ata atg ggc act gca	1488
Ile Val Ile Ile Thr Val Val Ala Ala Val Ile Met Gly Thr Ala	
485 490 495	
ggc ctc agc acg tac ctc tat aac cgc cag cgg aag atc aag aaa tac	1536
Gly Leu Ser Thr Tyr Leu Tyr Asn Arg Gln Arg Lys Ile Lys Lys Tyr	
500 505 510	
aga cta caa cag gcc caa aaa ggg acc ccc atg aaa ccg aac aca caa	1584
Arg Leu Gln Gln Ala Gln Lys Gly Thr Pro Met Lys Pro Asn Thr Gln	
515 520 525	
gcc acg cct ccc	1596
Ala Thr Pro Pro	
530	

[La secuencia de ADN tiene el SEC ID N.º: 1]
[La secuencia de proteína tiene el SEC ID N.º: 2]

FIGURA 9 (Cont.)

<210>	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					</
-------	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

FIGURA 9 (Cont.)

Pro Met Cys Gln Ala Trp Gly Asn Pro Leu Pro Glu Leu Lys Cys Leu
 420 425 430
 Lys Asp Gly Thr Phe Pro Leu Pro Ile Gly Glu Ser Val Thr Val Thr
 435 440 445
 Arg Asp Leu Glu Gly Thr Tyr Leu Cys Arg Ala Arg Ser Thr Gln Gly
 450 455 460
 Glu Val Thr Arg Lys Val Thr Val Asn Val Leu Ser Pro Arg Tyr Glu
 465 470 475 480
 Ile Val Ile Ile Thr Val Val Ala Ala Ala Val Ile Met Gly Thr Ala
 485 490 495
 Gly Leu Ser Thr Tyr Leu Tyr Asn Arg Gln Arg Lys Ile Lys Lys Tyr
 500 505 510
 Arg Leu Gln Gln Ala Gln Lys Gly Thr Pro Met Lys Pro Asn Thr Gln
 515 520 525
 Ala Thr Pro Pro
 530

[SEC ID N.º: 2]

<210> 3
 <211> 3003
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

```

gctataagga tcacgcgccc cagtcgacgc tgagctcctc tgetactcag agttgcaacc 60
tcagcctcgc tatggctccc agcagccccc ggccctgegt gccctgcactc ctgggtcctgc 120
tcggggctct gttcccagga cctggcaatg cccagacatc tgtgtccccc tcaaaagtc 180
tcctgccccg gggaggctcc gtgctggtga catgcagcac ctectgtgac cagcccaagt 240
tgttgggcat agagaccccc ttgcctaaaa aggagttgct cctgcctggg aacaaccgga 300
aggtgtatga actgagcaat gtgcaagaag atagccaacc aatgtgctat tcaaactgcc 360
ctgatgggca gtcaacagct aaaaccttcc tcacctgtg ctggactcca gaacgggtgg 420
aactggcacc cctccccctc tggcagccag tgggcaagaa ccttacccta cgtgcccagg 480
tggagggtgg ggcaccccgg gccaacctca ccgtggtgct gctccgtggg gagaaggagc 540
tgaaacggga gccagctgtg ggggagcccg ctgaggtcac gaccacggtg ctggtgagga 600
gagatcacca tggagccaat ttctcgtgcc gcactgaact ggacctgcgg ccccaagggc 660
tggagctgtt tgagaacacc tcggccccct accagctcca gaaccttgtc ctgccagcga 720
ctccccccca acttgtcagc ccccggttcc tagaggtgga cacgcagggg accgtggtct 780
gttccctgga cgggctgttc ccagtctcgg aggccaggt ccacctggca ctgggggacc 840
agaggttgaa ccccacagtc acctatggca acgactcctt ctgggccaag gcctcagtc 900
gtgtgaccgc agaggacgag ggcacccagc ggctgacgtg tgcagtaata ctggggaaac 960
agagccagga gacctgcag acagtgaaca tctacagctt tccggcgccc aacgtgattc 1020
tgacgaagcc agaggtctca gaagggaccg aggtgacagt gaagtgtgag gccacacct 1080
gagccaaggt gacgctgaat ggggttccag cccagccact gggcccgagg gccagctcc 1140
tgctgaaggc caccctagag gacaacgggc gcagcttctc ctgctctgca acctggagg 1200
tggccggcca gcttatcac aagaaccaga cccgggagct tcgtgtcctg tatggcccc 1260
gactggacga gagggattgt cgggaaaact ggacgtggcc agaaaattcc cagcagactc 1320
caatgtgcca ggcttggggg aaacctatgc ccgagctcaa gtgtctaaag gatggcactt 1380
tcccactgcc catcggggaa tcagtgaact tcaactgaga tcttgagggc acctacctc 1440
gtcggggccg gagcactcaa ggggaggtca cccgcaaggt gaccgtgaat gtgctctccc 1500
cccgggtatg gattgtcacc atcactgtgg tagcagccgc agtcataatg ggcactgcag 1560
gcctcagcac gtacctctat aaccgcccagc ggaagatcaa gaaatacaga ctacaacagg 1620
cccaaaaagg gacccccatg aaaccgaaca cacaagccac gcctccctga acctatcccc 1680
ggacaggggc tcttctctcg ccttcccata ttgggtggcag tgggtgccca ctgaacagag 1740
tgggaagacat atgccatgca gctacacctt cgggacctgg gacgcccggg gacagggcac 1800
tgtcctcagt cagatacaac agcatttggg gccatggtac ctgcacacct aaaacactag 1860
gccacgcacc tgatctgtag tcacatgact aagccaagag gaaggagcaa gactcaagac 1920
atgattgatg gatgttaaa tctagccctga tgagagggga agtgggtggg gagacatagc 1980
cccaccatga ggacatacaa ctgggaaata ctgaaacttg ctgectattg ggtatgctga 2040

```

FIGURA 9 (Cont.)

```

ggccccacag acttacagaa gaagtggccc tccatagaca tgtgtagcat caaaacacaa 2100
aggccccacac ttccctgacgg atgccagctt gggcactget gtctactgac .cccaaccctt 2160
gatgatatgt atttattcat ttgttatatt accagctatt tactgagtgt cttttatgta 2220
ggctaaatga acataggtct ctggcctcac ggagctccca gtccatgtca cattcaagggt 2280
caccaggtac agttgtacag gttgtacact gcaggagagt gcctggcaaa aagatcaaat 2340
ggggctggga cttctcattg gccaacctgc ctttccccag aaggagtgat tttctatcgt 2400
gcacaaaagc actatatgga ctggtaatgg ttacagggtt cagagattac ccagtggaggc 2460
cttattcctc ccttcccccc aaaactgaca cctttgttag ccacctccc accacatac 2520
atctctgcca gtgttcacaa tgacactcag cggtcatgtc tggacatgag tggccaggga 2580
atatgccccaa gctatgectt gteectctgt cctgtttgca ttctactggg agcttgcact 2640
attgcagctc cagtttctct cagtgatcag ggtcctgcaa gcagtgggga agggggccaa 2700
ggatattggag gactccctcc cagcttggga agctcctcc gcgtgtgtgt gtgtgtgtgt 2760
atgtgtagac aagctctctc tctgtcaccc aggctggagt gcagtgggtc aatcatggtt 2820
cactgcagtc ttgacctttt gggctcaagt gatccctcca cctcagcctc ctgagtacct 2880
gggaccatag gctcacacaa ccacacctgg caaatattgat tttttttttt tttttcagag 2940
acgggggtctc gcaacattgc ccagacttcc tttgtgttag ttaataaagc tttctcaact 3000
gcc 3003

```

[SEC ID N.º: 3]

<210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Ser Glu Lys Asp Glu Leu
 1 5

[SEC ID N.º: 4]

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Arg Ser Glu Lys Asp Glu Leu
 1 5

[SEC ID N.º: 5]

<210> 6
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6
tctgttccca ggaactagtt tggcacagac atctgtgtcc ccctcaaaag tc 52

[SEC ID N.º: 6]

<210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7
cataccgggg actagtcaca ttacagggtca cctcgggg 38

[SEC ID N.º: 7]

FIGURA 9 (Cont.)

<210> 8
 <211> 799
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> SCD
 <222> (1) ... (448)
 <223> Dominios extracelulares de ICAM-1

<220>
 <221> SCD
 <222> (453) ... (799)
 <223> IgA2m (2) humana

<400> 8
 Gln Thr Ser Val Ser Pro Ser Lys Val Ile Leu Pro Arg Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Val Leu Val Thr Cys Ser Thr Ser Cys Asp Gln Pro Lys Leu Leu Gly
 20 25 30
 Ile Glu Thr Pro Leu Pro Lys Lys Glu Leu Leu Leu Pro Gly Asn Asn
 35 40 45
 Arg Lys Val Tyr Glu Leu Ser Asn Val Gln Glu Asp Ser Gln Pro Met
 50 55 60
 Cys Tyr Ser Asn Cys Pro Asp Gly Gln Ser Thr Ala Lys Thr Phe Leu
 65 70 75 80
 Thr Val Tyr Trp Thr Pro Glu Arg Val Glu Leu Ala Pro Leu Pro Ser
 85 90 95
 Trp Gln Pro Val Gly Lys Asn Leu Thr Leu Arg Cys Gln Val Glu Gly
 100 105 110
 Gly Ala Pro Arg Ala Asn Leu Thr Val Val Leu Leu Arg Gly Glu Lys
 115 120 125
 Glu Leu Lys Arg Glu Pro Ala Val Gly Glu Pro Ala Glu Val Thr Thr
 130 135 140
 Thr Val Leu Val Arg Arg Asp His His Gly Ala Asn Phe Ser Cys Arg
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Asp Leu Arg Pro Gln Gly Leu Glu Leu Phe Glu Asn Thr
 165 170 175
 Ser Ala Pro Tyr Gln Leu Gln Thr Phe Val Leu Pro Ala Thr Pro Pro
 180 185 190
 Gln Leu Val Ser Pro Arg Val Leu Glu Val Asp Thr Gln Gly Thr Val
 195 200 205
 Val Cys Ser Leu Asp Gly Leu Phe Pro Val Ser Glu Ala Gln Val His
 210 215 220
 Leu Ala Leu Gly Asp Gln Arg Leu Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Asn
 225 230 235 240
 Asp Ser Phe Ser Ala Lys Ala Ser Val Ser Val Thr Ala Glu Asp Glu
 245 250 255
 Gly Thr Gln Arg Leu Thr Cys Ala Val Ile Leu Gly Asn Gln Ser Gln
 260 265 270
 Glu Thr Leu Gln Thr Val Thr Ile Tyr Ser Phe Pro Ala Pro Asn Val
 275 280 285
 Ile Leu Thr Lys Pro Glu Val Ser Glu Gly Thr Glu Val Thr Val Lys
 290 295 300
 Cys Glu Ala His Pro Arg Ala Lys Val Thr Leu Asn Gly Val Pro Ala
 305 310 315 320
 Gln Pro Leu Gly Pro Arg Ala Gln Leu Leu Lys Ala Thr Pro Glu
 325 330 335
 Asp Asn Gly Arg Ser Phe Ser Cys Ser Ala Thr Leu Glu Val Ala Gly
 340 345 350

FIGURA 9 (Cont.)

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

[SEC ID N.º: 8]

Figura 10:

1/1

GGT ACC ACT TCT CTC AAT CCA ACT TTC TAA ACA ATG GCT TCT AAA CCT TTC TTG TCT CTT
M A S K P F L S L

61/10

CTT TCT TTG TCT TTG CTT TTG TTC ACC TCT ACT AGT TTG GCT GAC CTG TAC TTC ATT TTG
L S L S L L L F T S T S L A D L Y F I L

121/30

GAC AAA TCA GGA AGT GTG CTG CAC CAC TGG AAT GAA ATC TAT TAC TTT GTG GAA CAG TTG
D K S G S V L H H W N E I Y Y F V E Q L

181/50

GCT CAC AAA TTC ATC AGC CCA CAG TTG AGA ATG TCC TTT ATT GTT TTC TCC ACC CGA GGA
A H K F I S P Q L R M S F I V F S T R G

241/70

ACA ACC TTA ATG AAA CTG ACA GAA GAC AGA GAA CAA ATC CGT CAA GGC CTA GAA GAA CTC
T T L M K L T E D R E O I R Q G L E E L

301/90

CAG AAA GTT CTG CCA GGA GGA GAC ACT TAC ATG CAT GAA GGA TTT GAA AGG GCC AGT GAG
Q K V L P G G D T Y M H E G F E R A S ,E

361/110

CAG ATT TAT TAT GAA AAC AGA CAA GGG TAC AGG ACA GCC AGC GTC ATC ATT GCT TTG ACT
Q I Y Y E N R Q G Y R T A S V I I A L T

421/130

GAT GGA GAA CTC CAT GAA GAT CTC TTT TTC TAT TCA GAG AGG GAG GCT AAT AGG TCT CGA
D G E L H E D L F F Y S E R E A N R S R

481/150

GAT CTT GGT GCA ATT GTT TAC TGT GTT GGT GTG AAA GAT TTC AAT GAG ACA CAG CTG GCC
D L G A I V Y C V G V K D F N E T Q L A

541/170

CGG ATT GCG GAC AGT AAG GAT CAT GTG TTT CCC GTG AAT GAC GGC TTT CAG GCT CTG CAA
R I A D S K D H V F P V N D G F Q A L Q

601/190

GGC ATC ATC CAC TCA ATT TTG AGC TCT GCT TCC CCA ACC AGC CCT AAG GTC TTC CCT CTC
G I I H S I L S S A S P T S P K V F P L

661/210

AGC CTT GAC AGC ACC CCT CAA GAT GGT AAT GTT GTC GTT GCT TGC CTT GTC CAG GGT TTC
S L D S T P Q D G N V V V A C L V Q G F

721/230

TTC CCT CAG GAG CCA CTC TCT GTT ACC TGG TCT GAA TCT GGA CAG AAT GTT ACC GCC AGA
F P Q E P L S V T W S E S G Q N V T A R

781/250

AAC TTC CCA CCT AGC CAG GAT GCC TCC GGT GAC CTC TAC ACC ACC AGC TCT CAG CTC ACC
N F P P S Q D A S G D L Y T T S S Q L T

841/270

CTT CCA GCC ACC CAG TGC CCA GAT GGT AAG TCC GTT ACC TGC CAT GTT AAG CAC TAC ACC
L P A T Q C P D G K S V T C H V K H Y T

901/290

AAC TCC AGC CAG GAT GTT ACT GTT CCA TGC CGT GTT CCA CCA CCT CCA CCA TGC TGC CAC
N S S Q D V T V P C R V P P P P P C C H

961/310

FIGURA 10 (cont.)

CCA CGT CTC TCT CTT CAC CGT CCT GCC CTT GAG GAC TTG CTC TTG GGT TCT GAA GCT AAC
P R L S L H R P A L E D L L L G S E A N

1021/330

CTC ACC TGC ACC CTC ACC GGT CTC AGA GAT GCC TCT GGT GCC ACC TTC ACC TGG ACC CCA
L T C T L T G L R D A S G A T F T W T P

1081/350

AGC TCT GGT AAG AGC GCT GTT CAA GGA CCA CCT GAG CGT GAC CTC TGT GGA TGC TAC TCT
S S G K S A V Q G P P E R D L C G C Y S

1141/370

GTT AGC TCT GTT CTT CCT GGT TGT GCC CAG CCT TGG AAC CAC GGT GAG ACC TTC ACC TGC
V S S V L P G C A Q P W N H G E T F T C

1201/390

ACT GCT GCC CAC CCA GAG TTG AAG ACC CCA CTT ACC GCC AAC ATC ACC AAG TCC GGA AAC
T A A H P E L K T P L T A N I T K S G N

1261/410

ACC TTC CGT CCC GAG GTC CAC CTC TTG CCA CCA CCA TCT GAG GAG CTT GCC CTC AAT GAG
T F R P E V H L L P P P S E E L A L N E

1321/430

CTT GTT ACC CTC ACC TGC CTT GCT CGT GGA TTC AGC CCA AAG GAT GTT CTT GTT AGG TGG
L V T L T C L A R G F S P K D V L V R W

1381/450

CTT CAG GGA TCT CAG GAG CTT CCA CGT GAG AAG TAC CTC ACT TGG GCT TCC CGT CAG GAG
L Q G S Q E L P R E K Y L T W A S R Q E

1441/470

CCA AGC CAG GGA ACT ACC ACC TAC GCT GTT ACC AGC ATC CTT CGT GTT GCT GCT GAG GAC

FIGURA 10 (cont.)

P S Q G T T T Y A V T S I L R V A A E D

1501/490

TGG AAG AAG GGT GAG ACC TTC TCC TGC ATG GTT GGT CAC GAG GCC CTT CCA CTT GCC TTC

W K K G E T F S C M V G H E A L P L A F

1561/510

ACC CAG AAG ACC ATT GAT CGT TTG GCT GGA AAG CCA ACC CAC ATC AAT GTT TCT GTT GTC

T Q K T I D R L A G K P T H I N V S V V

1621/530

1650/538

ATG GCT GAG GCT GAT GGA ACC TGC TAC TAA

M A E A D G T C Y *

FIGURA 10 (cont.)

Figura 11. pGPTV-kan-ocs-ATR-IgA2:

Bgl II

1

CTGGCCGCGCCAGATCTGGGGAACCTGTGGTTGGCATGCACATACAAATGGACGAACGGATAAACCTTTTC
ACGCCCTT

81

TTAAATATCCGATTATTCTAATAAACGCTCTTTTCTCTTAGGTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAAACACT
GATAGTTT

161

AAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGATCATGAGCGGAGAATTAAGGGAGTCACGTTATGACCCCGCCGAT
GACGCGGG

EcoR. I

241

ACAAGCCGTTTTACGTTTGGAAGTACAGAACCGCAACGTTGAAGGAGCCACTCAGCCGATCTGAATTCACT
GCTTTAAT

321

GAGATATGCGAGACGCCTATGATCGCATGATATTTGCTTTCAATTCTGTTGTGCACGTTGTAAAAACCTGA
GCATGTGT

401

AGCTCAGATCCTTACCGCCGGTTTCGGTTCATTCTAATGAATATATCACCCGTTACTATCGTATTTTTATGA
ATAATATT

481

CTCCGTTCAATTTACTGATTGTACCCTACTACTTATATGTACAATATTAAATGAAAACAATATATTGTGCT
GAATAGGT

Sac I Asc I

561

TTATAGCGACATCTATGATAGAGCGCCACAATAACAAACAATTGCGTTTTATTATTACAAATCCAATTTTGA
GCTCGGCG

641
CGCCAGCTGGACATCATGTTGGATATGAAACAAC TATTATTTATCTACATGTTTTAGATGTTATCTGATTAT
TTTTATAC

721
GTAGTCTTCTATTGATGAGGAGTCTAAGGCTATAGAATTATATATCTAAATGATTAAATATATATATTATTAA
TAATTAAC

801
AATAATTAATATATTATAATTTATATATATATATTTTATATTATTATAATAATATTCTTACAAATATAATTA
TTATATTC

881
GACGGTATCGGGGCAATTGTATTGACGGTATCGCGATAAGCTCGCGEATCCCTGAAAGCGACGTTGGATGT
TAACATCT

961
ACAAATTGCCTTTTCTTATCGACCATGTACGTAAGCGCTTACGTTTTTGGTGGACCCCTGAGGAAACTGGTA
GCTGTTGT

1041
GGGCCTGTGGTCTCAAGATGGATCATTAAATTTCCACCTTCACCTACGATGGGGGGCATCGCACC GG TGAGTA
ATATTGTA

1121
CGGCTAAGAGCGAATTTGGCCTGTAGGATCCCTGAAAGCGACGTTGGATGTTAACATCTACAAATTGCCTTT
TCTTATCG

1201
ACCATGTACGTAAGCGCTTACGTTTTTGGTGGACCCCTGAGGAAACTGGTAGCTGTTGTGGGCCTGTGGTCT
CAAGATGG

1281
ATCATTAAATTTCCACCTTCACCTACGATGGGGGGCATCGCACC GG TGAGTAATATTGTACGGCTAAGAGCGA
ATTTGGCC

1361
TG TAGGATCCCTGAAAGCGACGTTGGATGTTAACATCTACAAATTGCCTTTTCTTATCGACCATGTACGTAA
GCGCTTAC

1441
GTTTTTGGTGGACCCCTGAGGAAACTGGTAGCTGTTGTGGGCCTGTGGTCTCAAGATGGATCATTAAATTTCC
ACCTTCAC

FIGURA 11 (cont.)

1521

CTACGATGGGGGGCATCGCACCGGTGAGTAATATTGTACGGCTAAGAGCGAATTTGGCCTGTAGGATCCGCG
AGCTGGTC

1601

AATCCCATTTGCTTTTGAAGCAGCTCAACATTGATCTCTTTCTCGATCGAGGGAGATTTTCAAATCAGTGCG
CAAGACGT.

1681

GACGTAAGTATCCGAGTCAGTTTTATTCTTCTACTAATTTGGTCGTTTATTTGGCGTGTTAGGACATGGCA
ACCGGGCC

1761

TGAATTTGCGGGTATTCTGTTTCTATTCCAACTTTTCTTGATCCGCAGCCATTAAACGACTTTTGAATAGA
TACGCTGA

1841

CACGCCAAGCCTCGCTAGTCAAAAGTGTAACCAACAACGCTTTACAGCAAGAACGGAATGCGCGTGACGCTC
GCGGTGAC

1921

GCCATTTGCGCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCTTATTATATCTTCCCTTAATTAAGGTACCAC
TTCTCTCA

2001

ATCCAACTTTCTAAACAATGGCTTCTAAACCTTTCTTGCTCTCTCTTTCTTTGTCTTTGCTTTTGTTACCT
CTACTAGT

2081

TTGGCTGACCTGTACTTCATTTTGGACAAATCAGGAAGTGCTGCACTGGAATGAAATCTATTACTTT
GTGGAACA

2161

GTTGGCTCACAAATTCATCAGCCACAGTTGAGAATGTCCTTTATTGTTTTCTCCACCCGAGGAACAACCTT
AATGAAAC

2241

TGACAGAAGACAGAGAACAATCCGTCAAGGCCTAGAAGARTCCAGAAAGTTCTGCCAGGAGGAGACACTT
ACATGCAT

2321

GAAGGATTTGAAAGGGCCAGTGAGCAGATTTATTATGAAAACAGACAAGGGTACAGGACAGCCAGCGTCATC
ATTGCTTT

FIGURA 11 (cont.)

2401

GACTGATGGAGAACTCCATGAAGATCTCTTTTCTATTTCAGAGAGGGAGGCTAATAGGTCTCGAGATCTTGG
TGCAATTG

2481

TTTACTGTGTTGGTGTGAAAGATTTCAATGAGACACAGCTGGCCCCGGATTGCGGACAGTAAGGATCATGTGT
TTCCCCGTG

2561

AATGACGGCTTTTCAGGCTCTGCAAGGCATCATCCACTCAATTTTGAGCTCTGCTTCCCCAACCCAGCCCTAAG
GTCTTCCC

2641

TCTCAGCCTTGACAGCACCCCTCAAGATGGTAATGTTGTGCGTTGCTTGCCTTGTCCAGGGTTTCTTCCCTCA
GGAGCCAC

2721

TCTCTGTTACCTGGTCTGAATCTGGACAGAATGTTACCGCCAGAACTTCCCACCTAGCCAGGATGCCTCCG
GTGACCTC

2801

TACACCACCAGCTCTCAGCTCACCCCTTCAGCCACCCAGTGCCCGAGATGGTAAGTCCGTTACCTGCCATGTT
AAGCACTA

2881

CACCAACTCCAGCCAGGATGTTACTGTTCCATGCCGTGTTCCACCACCTCCACCATGCTGCCACCCACGTCT
CTCTCTTC

2961

ACCGTCTGCCCCCTGAGGACTTGCTCTTGGGTTCTGAAGCTAACCTCACCTGCACCCCTCACCGGTCTCAGAG
ATGCCTCT

3041

GGTGCCACCTTCACCTGGACCCCAAGCTCTGGTAAGAGCGCTGTTCAAGGACCACCTGAGCGTGACCTCTGT
GGATGCTA

3121

CTCTGTTAGCTCTGTTCTTCCTGGTTGTGCCAGCCTTGGAACCACGGTGAGACCTTCACCTGCACTGCTGC
CCACCCAG

3201

AGTTGAAGACCCCACTTACCGCCAACATCACCAAGTCCGGAAACACCTTCCGTCCCGAGGTCCACCTCTTGC
CACCACCA

FIGURA 11 (cont.)

3281

TCTGAGGAGCTTGCCCTCAATGAGCTTGTTACCCCTCACCTGCCTTGCTCGTGGATTGAGCCCAAAGGATGTT
CTTGTTAG

3361

GTGGCTTCAGGGATCTCAGGAGCTTCCACGTGAGAAGTACCTCACTTGGGCTTCCCGTCAGGAGCCAAGCCA
GGGAACTA

3441

CCACCTACGCTGTTACCAGCATCCTTCGTGTTGCTGCTGAGGACTGGAAGAAGGGTGAGACCTTCTCCTGCA
TGGTTGGT

3521

CACGAGGCCCTTCCACTTGCCCTTCACCCAGAAGACCATTGATCGTTTGGCTGGAAAGCCAACCCACATCAAT
GTTTCTGT

3601

TGTCATGGCTGAGGCTGATGGAACCTGCTACTAAGATCTGTGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTT
CTAGCTAG

3681

AGCGGCCGCCACCGCGGTGCGGAATTAACAGAGGTGGATGGACAGACCCGTTCTTACACCGGACTGGGCGCG
GGATAGGA

3761

TATTGAGATTGGGATGGGATTGAGCTTAAAGCCGGCGCTGAGACCATGCTCAAGGTAGGCAATGTCCTCAGC
GTCGAGCC

3841

CGGCATCTATGTCGAGGGCATTGGTGGAGCGCGCTTCGGGGATACCGTGCTTGTAAGTGAAGACCGGATATGA
GGCCCTCA

3921

CTCCGCTTGATCTTGGCAAAGATATTTGACGCATTTATTAGTATGTGTTAATTTTCATTTGCAGTGCAGTAT
TTTCTATT

4001

CGATCTTTATGTAATTCGTTACAATTAATAAATATTCAAATCAGATTATTGACTGTCAATTTGTATCAAATCG
TGTTTAAT

4081

GGATATTTTTATTATAATATTGATGATAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTT
GGCGTTAC

FIGURA 11 (cont.)

4161

CCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGCGCCAAGCTTCACGCTGCCGCAAGCAC
TCAGGGCG

4241

CAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGT
CAGCTACT

4321

GGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGACGTGGGCTTACATGGCGATA
GCTAGACT

4401

GGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCT
GCAAAGTA

4481

AACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCATGAGCGGAGAATTAAGGG
AGTCACGT

4561

TATGACCCCCGCGGATGACGCGGGACAAGCCGTTTTACGTTTGGAAGTACAGAACCGCAACGTTGAAGGAG
CCTACTCAG

4641

CCGCGGGTTTTCTGGAGTTTAATGAGCTAAGCACATACGTCAGAAACCATTATTGCGCGTTCAAAAGTCGCCT
AAGGTCAC

4721

TATCAGCTAGCAAATATTTCTTGTCAAAAATGCTCCACTGACGTTCCATAAATTCCCTCGGTATCCAATTA
GAGTCTCA

4801

TATTCACCTCTCAATCCAGATCTGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGC
CGCTTGGG

4881

TGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGT
CAGCGCAG

4961

GGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAAGTGCAGGACGAGGCAGCGCGG
CTATCGTG

FIGURA 11 (cont.)

5041

GCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCT
ATTGGGCG

5121

AAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAA
TGCGGCGG

5201

CTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACT
CGGATGGA

5281

AGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAG
GCTCAAGG

5361

CGCGCATGCCCGACGGCGATGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAA
ATGGCCGC

5441

TTTTCGGAATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGT
GATATTGC

5521

TGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCG
CATCGCCT

5601

TCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGAGGATCCCCGATGAGCTAAGCTAGCTATATC
ATCAATT

5681

ATGTATTACACATAATATCGCACTCAGTCTTTCATCTACGGCAATGTACCAGCTGATATAATCAGTTATTGA
AATATTT

5761

TGAATTTAACTTGCATCAATAAATTTATGTTTTGCTTGACTATAATACCTGACTTGTTATTTTATCAAT
AAATATTT

5841

AAACTATATTTCTTTCAAGATGGGAATTAAATTCACCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCC
TGGCGTTA

FIGURA 11 (cont.)

5921

CCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATC
GCCCTTCC

6001

CAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCGCCACGTTGCGCGG
CTTTCCCC

6081

GTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCCAAAAAC
TTGATTTG

6161

GGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTT
TTTAATAG

6241

TGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTATATAAGGGATTTT
GCCGATTT

6321

CGGAACCACCATCAAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCA
GGGCCAGG

6401

CGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACACCCAGTACATTAAAAACGTC
CGCAATGT

6481

GTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATATATCCTGCCACCAGCCAGCCAACAGCTCCC
CGACCGGC

6561 AGCTCGGCACAAAATCACCCTCGATACAGGCAGCCCATCAG

FIGURA 11 (cont.)

Figura 12. pGPTV-hpt-ocs-35SJ/SC

1

CTGATGGGCTGCCTGTATCGAGTGGTGATTTTGTGCCGAGCTGCCGGTCGGGGAGCTGTTGGCTGGCTGGTG
GCAGGATA

81

TATTGTGGTGTAACAAATTGACGCTTAGACAACTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTAATGTACTGGGGT
GGTTTTTC

161

TTTTCAACAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGT
CCACGCTG

241

GTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGSGTTCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAG
AATAGCCC

321

GAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAA
GGGCGAAA

401

AACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCG
TAAAGCAC

481

TAAATCGGAACCTTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG
AAGGGAAG

561

AAAGCGAAAGGAGCGGGCGCCATTCAAGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCT
ATTACGCC

641

AGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTT
GTAAAACG

721

ACGGCCAGTGAATTAATTCCCATCTTGAAAGAAATATAGTTTAAATATTTATTGATAAAATAACAAGTCAGG
TATTATAG

30 721

ACGGCCAGTGAATTAATTCCCATCTTGAAAGAAATATAGTTTAAATATTTATTGATAAAATAACAAGTCAGG
TATTATAG

801

TCCAAGCAAAAACATAAATTTATTGATGCAAGTTTAAATTCAGAAATATTTCAATAACTGATTATATCAGCT
GGTACATT

881

GCCGTAGATGAAAGACTGAGTGCGATATTATGTGTAATACATAAATTGATGATATAGCTAGCTTAGCTCATC
GGGGGATC

961

CCGGTCGGCATCTACTCTATTCCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTGGGGCGTCGGTTTCCACTATCGGCGAGTA
CTTCTACA

1041

CAGCCATCGGTCCAGACGGCCGCGCTTCTGCGGGCGATTTGTGTACGCCCCGACAGTCCCGGCTCCGGATCGG
ACGATTGC

1121

GTCGCATCGACCCTGCGCCCAAGCTGCATCATCGAAATTGCCGTCAACCAAGCTCTGATAGAGTTGGTCAAG
ACCAATGC

1201

GGAGCATATACGCCCGGAGCCGCGGGCGATCCTGCAAGCTCCGGATGCCTCCGCTCGAAGTAGCGCGTCTGCT
GCTCCATA

1281

CAAGCCAACCACGGCCTCCAGAAGAAGATGTTGGCGACCTCGTATTGGGAATCCCCGAACATCGCCTCGCTC
CAGTCAAT

1361

GACCGCTGTTATGCGGCCATTGTCCGTCAGGACATTGTTGGAGCCGAAATCCGCGTGACGAGGTGCCGGAC
TTCGGGGC

1441

AGTCCTCGGCCCCAAAGCATCAGCTCATCGAGAGCCTGCGCGACGGACGCACTGACGGTGTCGTCCATCACAG
TTTGCCAG

1521

TGATACACATGGGGATCAGCAATCGCGCATATGAAATCACGCCATGTAGTGTATTGACCGATTCCCTTGGCGT
CCGAATGG

1601

GCCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAGATCGGCCGAGCGATCGCATCCATGGCCTCCGCGACCGGCTGCAGAAC
AGCGGGCA

FIGURA 12 (cont.)

1681

GTTTCGGTTTCAGGCAGGTCCTTGCAACGTGACACCCCTGTGCACGGCGGGAGATGCAATAGGTCAGGCTCTCGC
TGAATGCC

1761

CCAATGTCAAGCACTTCCGGAATCGGGAGCGCGGCCGATGCAAAGTGCCGATAAACATAACGATCTTTGTAG
AAACCATC

1841

GGCGCAGCTATTTACCCGCAGGACATATCCACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAAGCAGGAGATTCTTCGCC
CTCCGAGA

1921

GCTGCATCAGGTCGGAGACGCTGTGGAACCTTTTCGATCAGAACTTCTCGACAGACGTCGCGGTGAGTTCAG
GCTTTTTC

2001

ATATCTTATTGCCCCCTAGAGTCGAGATCTGGATTGAGAGTGAATATGAGACTCTAATTGGATACCGAGGG
GAATTTAT

2081

GGAACGTCAGTGGAGCATTTTGTACAAGAAATATTTGCTAGCTGATAGTGACCTTAGGCGACTTTTGAAACGC
GCAATAAT

2161

GGTTTCTGACGTATGTGCTTAGCTCATTAAACTCCAGAAACCCGCGGCTGAGTGGCTCCTTCAACGTTGCCG
TTCTGTCA

2241

GTTCCAAACGTAAAACGGCTTGTCCCGCTCATCGGCGGGGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCTCCGCTC
ATGATCTT

2321

GATCCCCTGCGCCATCAGATCCTTGCGCGCAAGAAAGCCATCCAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTA
CCAGAGGG

2401

CGCCCCAGCTGGCAATTCCGGTTCGCTTGCTGTCCATAAAACCGCCAGTCTAGCTATCGCCATGTAAGCCC
ACTGCAAG

2481

CTACCTGCTTTCTCTTTGCGCTTGCGTTTTCCCTTGTCAGATAGCCAGTAGCTGACATTCATCCGGGGTCA
GCACCGTT

FIGURA 12 (cont.)

2561

TCTGCGGACTGGCTTTCTACGTGTTCCGCTTCCTTTAGCAGCCCTTGCGCCCTGAGTGCTTGCGGCAGCGTG
AAGCTTGG

2641

CGCGCCAGCTGGACATCATGTTGGATATGAAACAACCTATTATTTATCTACATGTTTTAGATGTTATCTGATT
ATTTTTAT

2721

ACGTAGTCTTCTATTGATGAGGAGTCTAAGGCTATAGAATTATATATCTAAATGATTAATATATATATTATT
AATAATTA

2801

ACAATAATTAATATATTATAATTTATATATATATATTTTATATTATTATAATAATATTCTTACAAATATAAT
TATTATAT

2881

TCGACGGTATCGGGCAATTGATTCCCGATCCTATCTGTCACTTCATCAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGT
GGCACCTA

2961

CAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCATTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGG
ACCCCCAC

3041

CCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCT
CCACTGAC

3121

GTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCAATTCATTG
GAGAGGAC

3201

ACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAGGTACCATGGTGCTCTTCGTGCTCACCTGCCTGCTGGCGGTCT
TCCCAGCC

3281

ATCTCCACGAAGAGTCCCATATTTGGTCCCGAGGAGGTGAATAGTGTGGAAGGTAACCTCAGTGTCCATCACG
TGCTACTA

3361

CCCACCCACCTCTGTCAACCGGCACACCCGGAAGTACTGGTGCCGGCAGGGAGCTAGAGGTGGCTGCATAAC
CCTCATCT

FIGURA 12 (cont.)

3441

CCTCGGAGGGCTACGTCTCCAGCAAATATGCAGGCAGGGCTAACCTCACCAACTTCCCGGAGAACGGCACAT
TTGTGGTG

3521

AACATTGCCCAGCTGAGCCAGGATGACTCCGGGCGCTACAAGTGTGGCCTGGGCATCAATAGCCGAGGCCTG
TCCTTTGA

3601

TGTCAGCCTGGAGGTCAGCCAGGGTCCTGGGCTCCTAAATGACACTAAAGTCTACACAGTGGACCTGGGCAG
AACGGTGA

3681

CCATCAACTGCCCTTTCAAGACTGAGAATGCTCAAAAGAGGAAGTCTTGTAACAAGCAGATAGGCCTGTACC
CTGTGCTG

3761

GTCATCGACTCCAGTGGTTATGTGAATCCCAACTATACAGGAAGAATACGCCTTGATATTAGGGTACTGGC
CAGTTACT

3841

GTTCAGCGTTGTATCAACCAACTCAGGCTCAGCGATGCTGGGCAGTATCTCTGCCAGGCTGGGGATGATTC
CAATAGTA

3921

ATAAGAAGAATGCTGACCTCCAAGTGCTAAAGCCCGAGCCCGAGCTGGTTTATGAAGACCTGAGGGGCTCAG
TGACCTTC

4001

CACGTGCCCCCTGGGCCCTGAGGTGGCAAACGTGGCCAAATTTCTGTGCCGACAGAGCAGTGGGGAAAACGTG
GACGTGGT

4081

CGTCAACACCCTGGGGAAGAGGGCCCCAGCCTTTGAGGGCAGGATCCTGCTCAACCCCCAGGACAAGGATGG
CTCATTCA

4161

GTGTGGTGATCACAGGCCTGAGGAAGGAGGATGCAAGGCGCTACCTGTGTGGAGCCCATTCGGATGGTCAGC
TGCAGGAA

4241

GGCTCGCCTATCCAGGCCTGGCAACTCTTCGTCAATGAGGAGTCCACGATTCCCCGAGCCCCACTGTGGTG
AAGGGGGT

FIGURA 12 (cont.)

4321

GGCAGGAAGCTCTGTGGCCGTGCTCTGCCCCCTACAACCGTAAGGAAAGCAAAAGCATCAAGTACTGGTGTCT
CTGGGAAG

4401

GGGCCCAGAATGGCCGCTGCCCCCTGCTGGTGGACAGCGAGGGGTGGGTTAAGGCCAGTACGAGGGCCGCC
TCTCCCTG

4481

CTGGAGGAGCCAGGCAACGGCACCTTCACTGTTCATCTCAACCAGCTCACCAGCCGGGACGCCGGCTTCTAC
TGGTGTCT

4561

GACCAACGGCGATACTCTCTGGAGGACCACCGTGGAGATCAAGATTATCGAAGGAGAACCAAACCTCAAGGT
TCCCGGGA

4641

ATGTCACGGCTGTGCTGGGAGAGACTCTCAAGGTCCCCTGTCACTTTCCATGCAAATTCTCCTCGTACGAGA
AATACTGG

4721

TGCAAGTGGAAATAACACGGGCTGCCAGGCCCTGCCAGCCAAGACGAAGGCCCCAGCAAGGCCTTCGTGAAC
TGTGACGA

4801

GAACAGCCGGCTTGTCTCCCTGACCCTGAACCTGGTGACCAGGGCTGATGAGGGCTGGTACTGGTGTGGAGT
GAAGCAGG

4881

GCCACTTCTATGGAGAGACTGCAGCCGTCTATGTGGCAGTTGAAGAGAGGAAGGCAGCGGGGTCCCGCGATG
TCAGCCTA

4961

GCGAAGGCAGACGCTGCTCCTGATGAGAAGGTGCTAGACTCTGGTTTTTCGGGAGATTGAGAACAAAGCCATT
CAGGATCC

5041

CAGGCTTTTTGCAGAGTGAATTTCGTTTCGTATCATCGGTTTCGACAACGTTTCGTCAAGTTCAATGCATCAGTT
TCATTGCG

5121

CACACACCAGAATCCTACTGAGTTCGAGTATTATGGCATTGGGAAAACGTTTTTCTTGTACCATTGTGTGT
GCTTGTA

FIGURA 12 (cont.)

5201

TTTACTGTGTTTTTTATTTCGGTTTTTCGCTATCGAACTGTGAAATGGAAATGGATGGAGAAGAGTTAATGAAT
GATATGGT

5281

CCTTTTGTTCATTCTCAAATTAATATTATTTGTTTTTCTCTTATTTGTTGTGTGTTGAATTTGAAATTATA
AGAGATAT

5361

GCAAAACATTTTGTGTTTGAAGTAAAAATGTGTCAAATCGTGGCCTCTAATGACCGAAGTTAATATGAGGAGTAA
AACACTTG

5441

TAGTTGTCGACGGTATCGATATTAATTCCCGATCCTATCTGTCACTTCATCAAAGGACAGTAGAAAAGGAA
GGTGGCAC

5521

CTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCATTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGA
TGGACCCC

5601

CACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATA
TCTCCACT

5681

GACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAT
TTGGAGAG

5761

GACACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTAGAGTACCATGGAGAACCATTGCTTTTCTGGGGAGTCTGGCG
GTTTTTAT

5841

TAAGGCTGTTTCATGTGAAAGCCCCAAGAAGATGAAAGGATTGTTCTTGTTGACAACAAATGTAAGTGTGCCCCG
GATTACTT

5921

CCAGGATCATCCGTTCTTCCGAAGATCCTAATGAGGACATTGTGGAGAGAAACATCCGAATTATTGTTCCCTC
TGAACAAC

6001

AGGGAGAATATCTCTGATCCACCTCACCATTGAGAACCAGATTGTTGTGTACCATTGTTCTGACCTCTGTAAA
AAATGTGA

FIGURA 12 (cont.)

6081

TCCTACAGAAAGTGGAGCTGGATAATCAGATAGTTACTGCTACCCAGAGCAATATCTGTGATGAAGACAGTGC
TACAGAGA

6161

CCTGCTACACTTATGACAGAAACAAGTGCTACACAGCTGTGGTCCCACTCGTATATGGTGGTGAGACCAAAA
TGGTGGAA

6241

ACAGCCTTAACCCCAGATGCCTGCTATCCTGACTGAATCCGCGGCGATGAGCTAAGCTAGCTATATCATCAA
TTTATGTA

6321

TTACACATAATATCGCACTCAGTCTTTCATCTACGGCAATGTACCAGCTGATATAATCAGTTATTGAAATAT
TTCTGAAT

6401

TTAAACTTGCATCAATAAATTTATGTTTTTGCTTGGACTATAATACCTGACTTGTTATTTTATCAATAAATA
TTTAAACT

6481

ATATTTCTTTCAAGAGCTCAAATTTGGATTTGTAATAATAAAACGCAATTGTTTGTATTGTGGCGCTCTAT
CATAGATG

6561

TCGCTATAAACCTATTTCAGCACAAATATATTGTTTTTCATTTTAATATTGTACATATAAGTAGTAGGGTACAAT
CAGTAAAT

6641

TGAACGGAGAATATTATTCTATAAAAATACGATAGTAACGGGTGATATATTCATTAGAATGAACCGAAACCGG
CGGTAAGG

6721

ATCTGAGCTACACATGCTCAGGTTTTTTACAACGTGCACAACAGAATTGAAAGCAAATATCATGCGATCATA
GGCGTCTC

6801

GCATATCTCATTAAAGCAGTGAATTCAGATCGGCTGAGTGGCTCCTTCAACGTTGCGGTTCTGTCAGTTCCA
AACGTAAA

6881

ACGGCTTGTCCTCGCTCATCGGCGGGGTATAACGTGACTCCCTTAATTCTCCGCTCATGATCAGATTGTCG
TTTCCCGC

FIGURA 12 (cont.)

6961

CTTCAGTTTAAACTATCAGTGTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTATTAG
AATAATCG

7041

GATATTTAAAAGGGCGTGAAAAGGTTTATCCGTTTCGTCCATTTGTATGTGCATGCCAACCACAGGTTCCCCA
GATCTGGC

7121 GCCGGCCAG

FIGURA 12 (cont.)

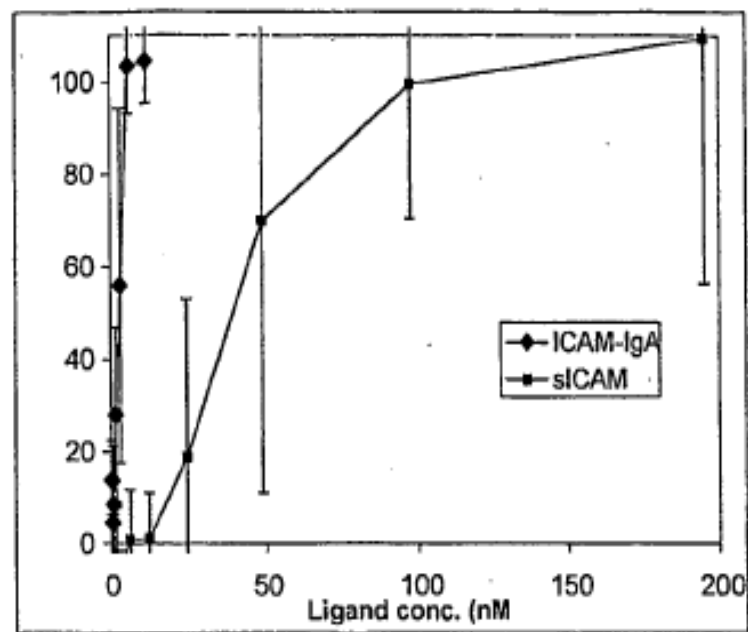


Figura 13

```

1                               60
CMG2-IgG QEQPSCRRAFDLYFVLDKSGSVANNWIEIYNFVQQLAERFVSPERMRLSFIVFSSQATIIL

61                               120
CMG2-IgG PLTGDRGKISKGLEDLKRVSPVGETYIHEGLKLANEQIQKAGGLKTSSIIIALTDGKLDG

121                              180
CMG2-IgG LVPSYAEKEAKISRSLGASVYCVGVLDFFEQAQLERIASKEQVFPVKGGFQALKGIINSI

181          3 |Cy1→          240
CMG2-IgG LAQSCTEILELQPSVVCVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
V1 LAQSC-----SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
V2a LAQSCTEILELQPSVVCV-----
V2b LAQSC-----
V3 LAQSCGGGSGGGSGGG---SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV

241          1          2 |Cy2→
CMG2-IgG SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
V1 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
V2a -----SSE
V2b -----SSE
V3 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE

301                              360
CMG2-IgG PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
V1 PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
V2a PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
V2b PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
V3 PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

361                              420
CMG2-IgG WYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI

|Cy3→          480
CMG2-IgG SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP

481                              531
CMG2-IgG VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

V2b =

```

SEQ ID NO: 114 QEQPSCRRAFDLYFVLDKSGSVANNWIEIYNFVQQLAERFVSPERMRLSFIVFSSQATIIL
PLTGDRGKISKGLEDLKRVSPVGETYIHEGLKLANEQIQKAGGLKTSSIIIALTDGKLDG
LVPSYAEKEAKISRSLGASVYCVGVLDFFEQAQLERIASKEQVFPVKGGFQALKGIINSI
LAQSC SSE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

Figura 14

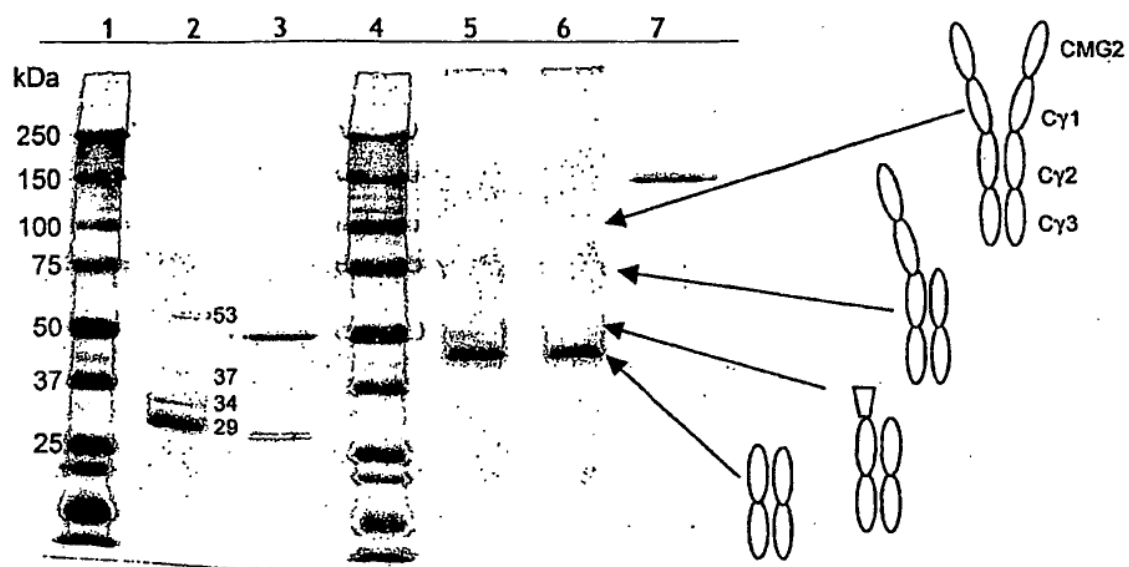


Figura 15

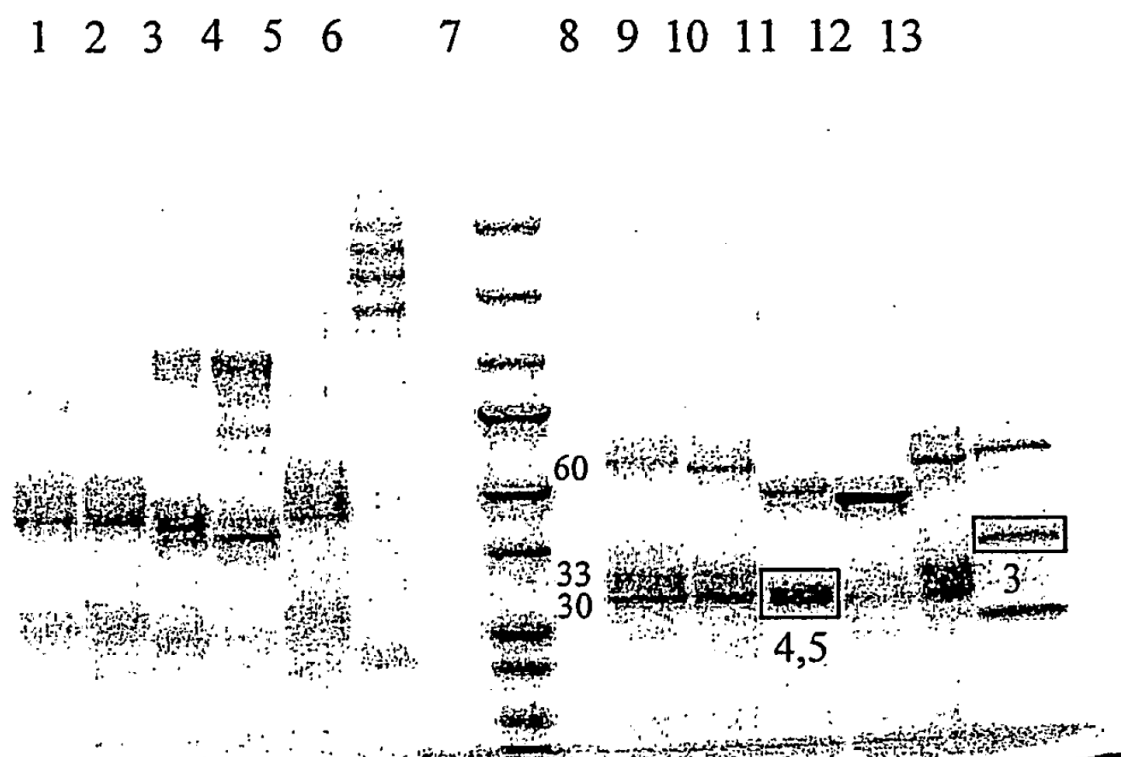


Figura 16

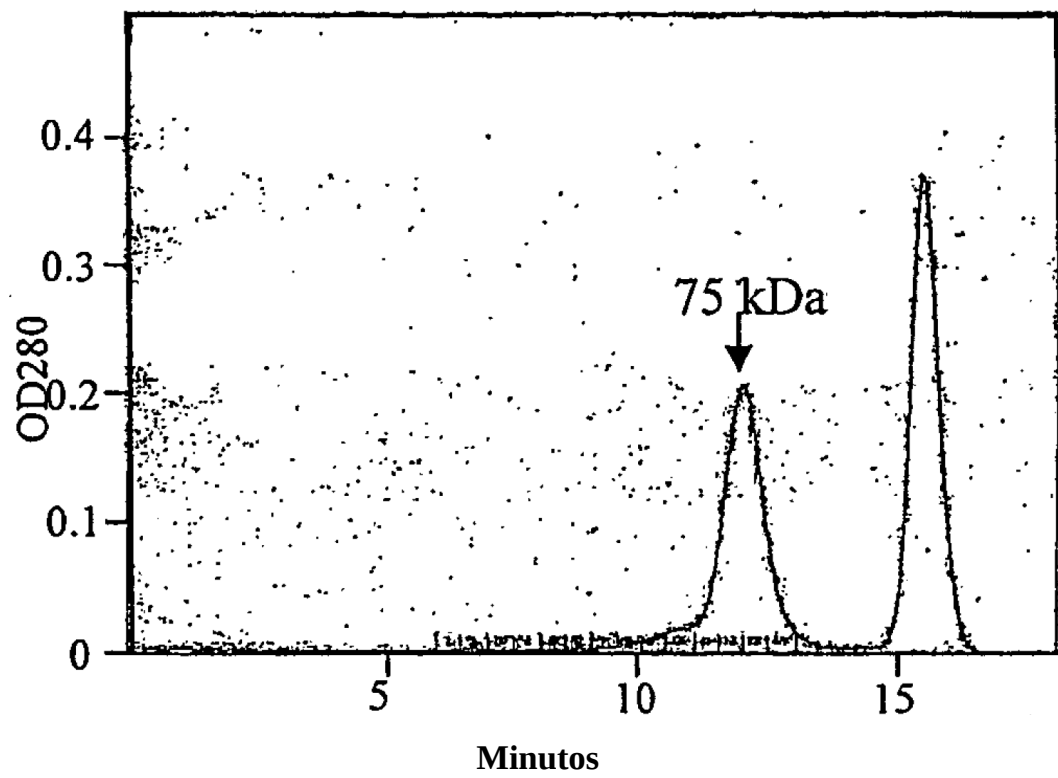


Figura 17

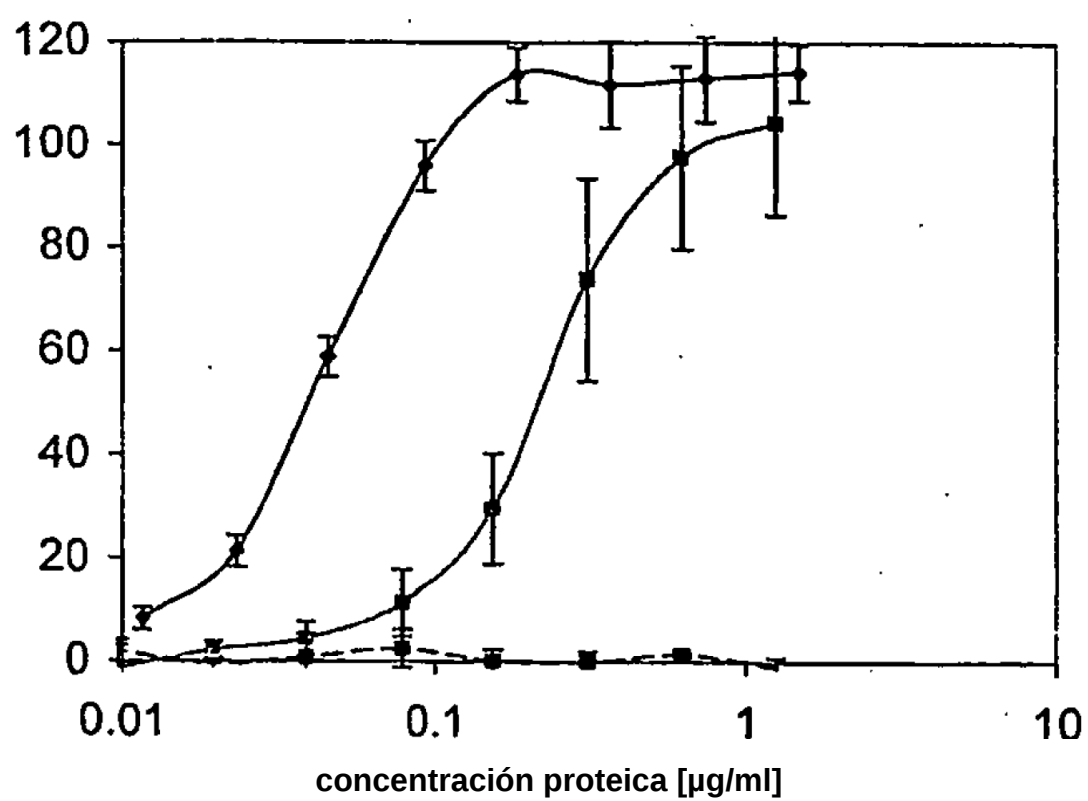


Figura 18

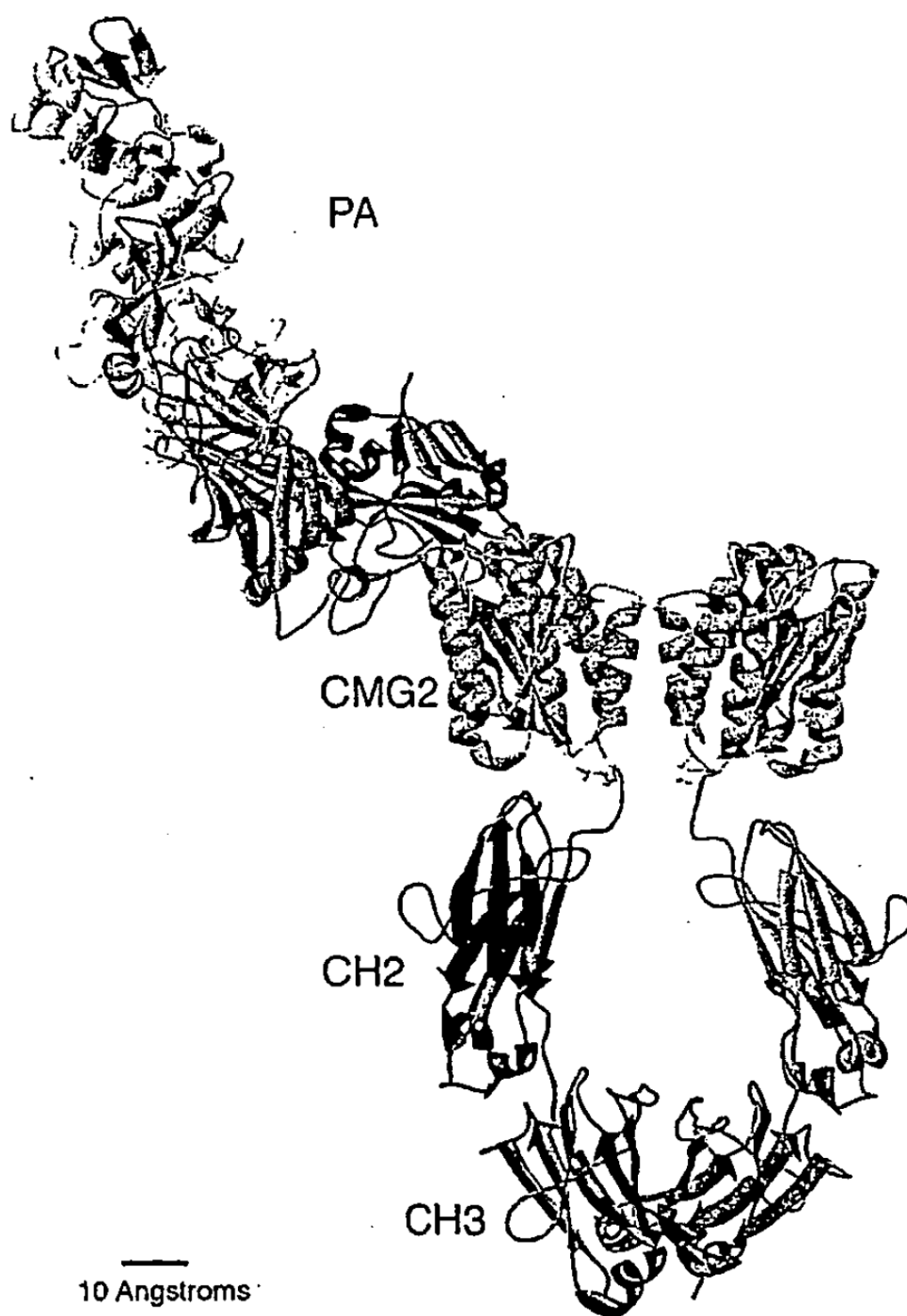


Figura 19

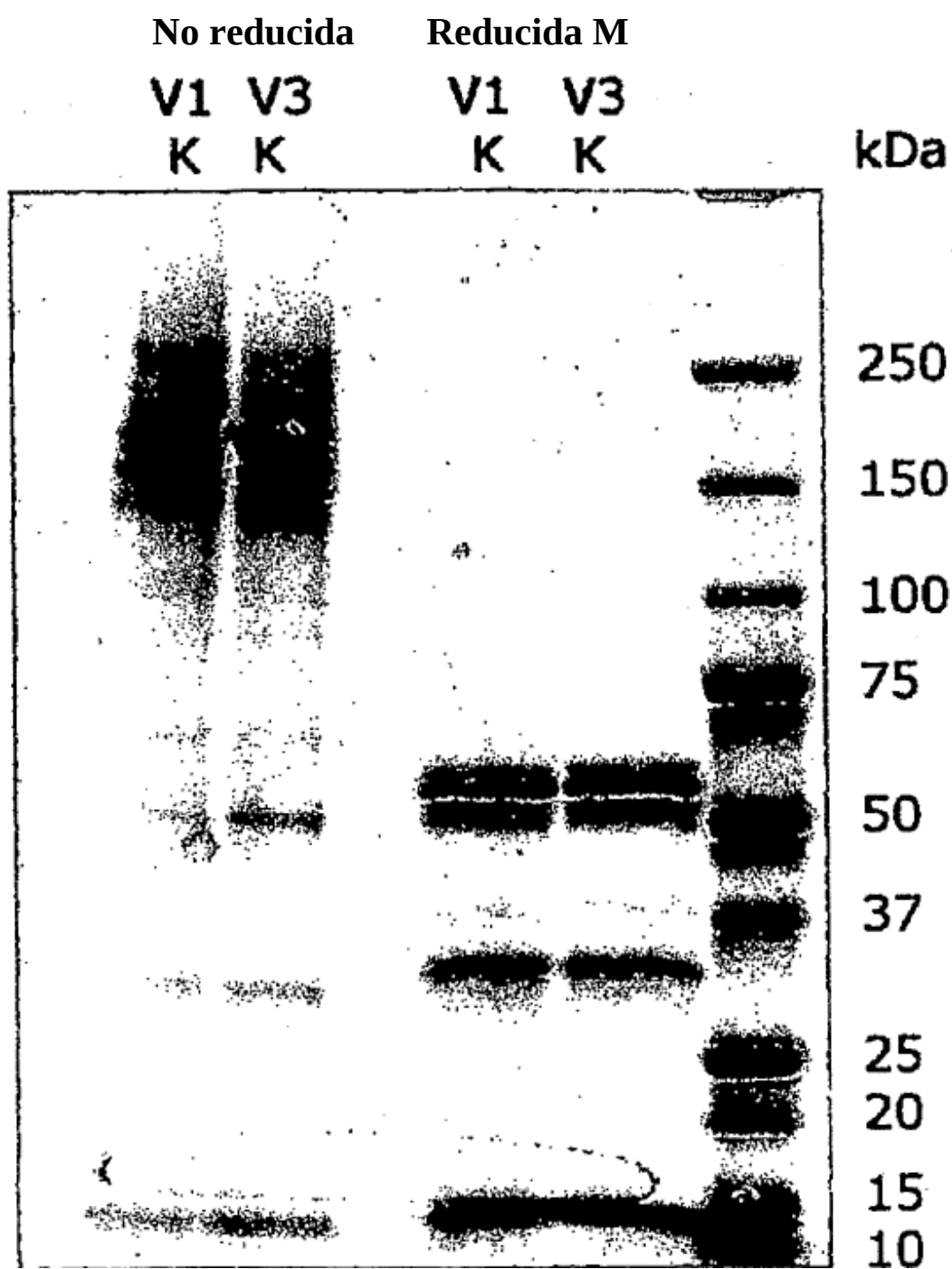


Figura 20