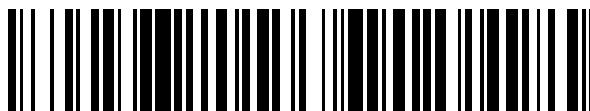


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 751**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**C07K 14/775** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2011 E 11748406 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2611900**

54 Título: **Alimento alcalino**

30 Prioridad:

**30.08.2010 EP 10008997**

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

**08.02.2016**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**SCHANTZ, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 558 751 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Alimento alcalino

5 En la presente memoria se informa de un método para el cultivo de alta densidad celular de una célula procariótica, tal como una cepa de *Escherichia coli*, en un medio químicamente definido para la producción de un polipéptido, en el que se alimenta un aminoácido mediante una solución alcalina concentrada regulando simultáneamente el pH del medio de cultivo y actuando de fuente de nitrógeno.

10 Antecedentes de la invención

En los últimos años se ha incrementado de manera constante la producción de proteínas y es probable que en el futuro cercano las proteínas se conviertan en el grupo más grande de terapéuticos disponibles para el tratamiento de diversas enfermedades. El impacto de las proteínas deriva de su especificidad, tal como la función específica de reconocimiento y unión a dianas.

15 Los cultivos celulares se utilizan en procedimientos de fermentación para producir sustancias y, en particular, proteínas. Se establece una distinción entre procedimientos en los que los cultivos celulares no han sido genéticamente modificados y forman sus propios productos metabólicos, y procedimientos en los que los organismos se han modificado genéticamente de manera que producen una cantidad más elevada de sus propias sustancias, tales como proteínas, o producen sustancias foráneas. Los organismos productores de las sustancias se proveen de un medio nutritivo que garantiza la supervivencia de los organismos y permite la producción del compuesto diana deseado. Se conocen numerosos medios de cultivo para dichos propósitos que permiten un cultivo óptimo del huésped específico.

20 Se informa de un cultivo de alta densidad celular de *Escherichia coli* en Riesenber (Riesenber D. et al., Curr. Opin. Biotechnol. 2:380-384, 1991) y en Horn (Horn U. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 46:524-532, 1996). Riesenber D. y Guthke R. (Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:422-430, 1999) informan del cultivo de alta densidad celular de microorganismos. Se proporciona una revisión del cultivo de *E. coli* hasta altas densidades celulares en Shiloach J. y Fass R. (Biotechnol. Advances 23:345-357, 2005).

25 En el documento nº WO 91/10721 se informa de un procedimiento para la fermentación a elevada densidad celular de *Escherichia coli* en una caldera fermentadora bajo agitación. Se informa de un método de producción y purificación de ADN plasmídico en el documento nº WO 97/29190. Se informa del control del crecimiento de los cultivos de microorganismos sumergidos aeróbicos mediante el control de la concentración de oxígeno disuelto y la tas de transferencia de oxígeno en la patente DD nº 295867. En la patente EP nº 0 866 876 se informa de un procedimiento para la preparación de proteínas recombinantes en *E. coli* mediante fermentación a alta densidad celular.

40 En el documento nº WO 03/048374 se informa de un procedimiento para la producción de metabolito de aminoácido aromático o derivado del mismo. En el documento nº WO 97/21829 se informa de un procedimiento para la preparación de proteínas recombinantes en *E. coli* mediante fermentación de alta densidad celular

45 Descripción resumida de la invención

Se ha encontrado que una célula procariótica, especialmente una cepa de *E. coli* K12 auxotrófica para un aminoácido, puede cultivarse en un medio químicamente definido a elevadas densidades celulares en el caso de que se añada un aminoácido al medio de cultivo en una solución alcalina.

50 Se da a conocer en la presente memoria un método para el cultivo de una célula bacteriana, especialmente una célula de *E. coli*, a elevadas densidades celulares, en el que la célula expresa un polipéptido recombinante, en el que el cultivo comprende la adición de una solución alcalina de un aminoácido seleccionado de entre aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptófano y tirosina durante el cultivo,

55 en el que el aminoácido presenta una concentración en la solución alcalina que es más alta que su solubilidad en agua a 20°C y a pH neutro, y en el que el peso de células secas de la célula bacteriana en cultivo es en un punto del cultivo de por lo menos 20 g/l.

60 Un aspecto tal como se informa en la presente memoria es un método para producir un polipéptido que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una célula bacteriana, especialmente una célula de *E. coli*, que comprende un ácido nucleico codificante de un polipéptido,
- b) cultivar la célula proporcionada,

c) ajustar el valor del pH durante el cultivo con una solución alcalina que comprende un aminoácido seleccionado de entre aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano y tirosina,

5 d) recuperar el polipéptido a partir de la célula o del medio de cultivo, produciendo de esta manera el polipéptido, en el que el aminoácido presenta una concentración en la solución alcalina de 30 g/l o superior, y

en el que la solución alcalina es una solución de amonio al 10% (p/v) o superior. Se informa en la presente memoria de la utilización de una solución alcalina que comprende un aminoácido para ajustar el valor del pH durante el cultivo de una célula bacteriana.

10 Se informa en la presente memoria de la utilización de una solución alcalina de un aminoácido como alimento en el cultivo de una célula bacteriana, en el que el aminoácido se selecciona de entre aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptófano y tirosina y el cultivo se realiza hasta un peso de células secas de 20 g/l o superior.

15 A continuación se proporcionan realizaciones específicas de todos los aspectos tal como se ha indicado de manera general anteriormente.

20 En una realización, el aminoácido es un aminoácido de solubilidad en agua pobre. En una realización, la célula bacteriana es una célula auxotrófica para un aminoácido y la auxotrofia es para un aminoácido seleccionado de entre aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptófano y tirosina. En otra realización, la célula bacteriana es una célula de *Escherichia coli* o un mutante de la misma. En una realización adicional, el aminoácido presenta una solubilidad en agua a 20°C de 50 g/l o inferior. En una realización adicional, el aminoácido presenta una solubilidad en agua a 20°C de 40 g/l o inferior.

25 En una realización adicional, el aminoácido se selecciona de entre aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano y tirosina. En otra realización, el aminoácido se selecciona de entre aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, histidina, leucina, triptófano y tirosina. En una realización, el aminoácido es la leucina. En todavía otra realización, el aminoácido presenta una concentración en la solución alcalina que es superior a su solubilidad en agua a 20°C. En una realización, la solubilidad es dos veces superior, en otra realización es tres veces superior a la solubilidad en agua a 20°C. En otra realización, la solubilidad es superior a la solubilidad en agua a 20°C y a un valor de pH de entre 6 y 8.

30 En una realización, el aminoácido presenta una concentración de 35 g/l o superior en la solución alcalina. En una realización, el aminoácido presenta una concentración en la solución alcalina de 45 g/l o superior. En una realización, el aminoácido presenta una concentración en la solución alcalina de aproximadamente 50 g/l. En una realización adicional, la solución alcalina presenta un valor de pH de 9 o superior; en una realización adicional, de 10 o superior, y en todavía otra realización, de 10,5 o superior. En una realización, la solución alcalina es una solución de amonio al 15% (p/v) o superior. En una realización, la solución alcalina es una solución de amonio aproximadamente al 12,5 % (p/v) en agua. En una realización además el polipéptido es la apolipoproteína A humana o un derivado de la misma. En una realización adicional, la apolipoproteína A1 presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 01 y SEC ID nº 35. En una realización, el polipéptido presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 01, SEC ID nº 02, SEC ID nº 34 ó SEC ID nº 35.

#### Descripción detallada de la invención

45 En la presente memoria se informa de un método para el cultivo de una célula procariótica, por ejemplo una célula bacteriana auxotrófica para un aminoácido, en el que se añade en una solución alcalina por lo menos un aminoácido, por ejemplo aquel para el que la célula es auxotrófica.

50 Se ha encontrado que una célula procariótica, por ejemplo una cepa de *E. coli* K12 auxotrófica para un aminoácido, puede cultivarse a densidades celulares elevadas en el caso de que se añada al medio de cultivo en una solución alcalina un alimento que comprende por lo menos un aminoácido, tal como aquel para el que la célula presenta auxotrofia. Lo anterior resulta especialmente ventajoso en el caso de que el aminoácido sea pobremente soluble en agua y la solubilidad pueda incrementarse mediante la disolución del aminoácido en una solución alcalina. Simultáneamente, la solución alcalina puede utilizarse para ajustar el valor del pH del medio de cultivo. Mediante la combinación de la solución del aminoácido y la solución de ajuste del pH en una única solución nutritiva altamente concentrada puede reducirse el volumen añadido, permitiendo de esta manera un cultivo de alta densidad celular de la célula procariótica. Además, se ha encontrado que una concentración de por lo menos 45 g/l del aminoácido en la solución nutritiva alcalina resulta en una producción incrementada del polipéptido recombinante.

60 En una realización, el método para el cultivo de una célula procariótica comprende las etapas siguientes:

a) proporciona una célula procariótica,

b) cultivar la célula procariótica,

c) ajustar el valor del pH durante el cultivo de la célula procariótica con una solución alcalina que comprende un aminoácido seleccionado de entre aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, histidina, isoleucina,

65 leucina, metionina, fenilalanina, triptófano y tirosina.

- Una "célula procariótica auxotrófica para un aminoácido" es una célula procariótica que no puede sintetizar un aminoácido esencial, por ejemplo debido a una mutación o delección dentro de un locus génico que comprende el gen estructural codificante de las proteínas de la ruta biosintética correspondiente. Sin la adición del aminoácido respectivo al medio de cultivo no puede proliferar la célula. La auxotrofia puede ser para cualquier aminoácido. La célula procariótica también puede ser auxotrófica para más de un aminoácido. De esta manera, en una realización, la célula procariótica auxotrófica para un aminoácido es auxotrófica para como mínimo un aminoácido. En otra realización, la célula procariótica auxotrófica para un aminoácido es auxotrófica para por lo menos un, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro o por lo menos cinco aminoácidos. En una realización adicional, la célula procariótica auxotrófica para un aminoácido es auxotrófica para un máximo de 5, o un máximo de 10 o un máximo de 15 aminoácidos. En otra realización, la célula procariótica auxotrófica para un aminoácido es auxotrófica para uno a cinco aminoácidos, o uno a tres aminoácidos, o para uno a dos aminoácidos, o para un aminoácido, o para dos aminoácidos, o para tres aminoácidos, o para cuatro aminoácidos. La célula procariótica auxotrófica para un aminoácido es, en una realización, una célula bacteriana.
- En una realización, la célula es una célula de *Escherichia*, o una célula de *Bacillus*, o una célula de *Lactobacillus*, o una célula de *Corynebacterium* o una célula de levadura (*Saccharomyces*, *Candida* o *Pichia*). En una realización adicional, la célula es una célula de *Escherichia coli*, o una célula de *Bacillus subtilis*, o una célula de *Lactobacillus acidophilus*, o una célula de *Corynebacterium glutamicum* o una célula de levadura de *Pichia pastoris*.
- La expresión "ajustar un valor" se refiere a que el valor respectivo se mantiene en un nivel predeterminado durante el cultivo, es decir, el valor se comprueba continuamente o a intervalos de tiempos constantes predeterminados y se modifica mediante la adición de un líquido de corrección en el caso de que el valor se encuentre fuera de un intervalo de aceptación prefijado. Por ejemplo, la expresión "ajustar el valor del pH" se refiere a que el valor del pH de un medio de cultivo se determina periódicamente a tiempos fijados, es decir, con intervalos de tiempo fijados, y en el caso de que el valor de pH determinado se encuentre fuera de un intervalo de aceptación, tal como, por ejemplo, 0,1 unidades de pH o 0,15 unidades de pH o 0,2 unidades de pH, se reajusta el valor del pH hasta el valor predeterminado de pH mediante la adición de un líquido de corrección, tal como una solución ácida o alcalina.
- Los métodos para el cultivo de una célula procariótica y también para el cultivo de una célula procariótica auxotrófica para un aminoácido son conocidos por el experto en la materia (ver, por ejemplo, Riesenber D. et al., Curr. Opin. Biotechnol. 2:380-384, 1991). El cultivo puede llevarse a cabo con cualquier método. En una realización, el cultivo es por lotes, por lotes alimentado, mediante perfusión, semicontinuo, o con retención celular total o parcial. El único requisito para el cultivo es que debe añadirse una solución alcalina. Dicha adición puede ser una única solución de alimentación o en forma de solución combinada de alimentación y de ajuste del pH.
- El medio de cultivo utilizado para el inicio del cultivo de la célula puede ser cualquier medio conocido por el experto en la materia, en el que la concentración del aminoácido que debe alimentarse se encuentran en el medio a una concentración inferior a 5 g/l, o inferior a 7,5 g/l o inferior a 10 g/l. Debe mencionarse que la concentración de los compuestos correspondientes debe seleccionarse de manera que no se prevea ninguna interferencia negativa con el crecimiento de la célula. En una realización el medio es un medio definido de glucosa-sales minerales.
- En una realización, el cultivo es un cultivo a alta densidad celular. La expresión "cultivo a alta densidad celular" se refiere a un método de cultivo en el que el peso de células secas de la célula procariótica en cultivo es en un punto durante el cultivo de por lo menos 10 g/l. En una realización, el peso de células secas es en un punto durante el cultivo de por lo menos 20 g/l, o de por lo menos 50 g/l o de por lo menos 100 g/l o superior a 100 g/l. Con el fin de alcanzar un estado de densidad celular tan elevada, el volumen de las soluciones de alimentación y/o ajuste añadidas durante el cultivo debe ser tan pequeño como resulte posible. Los métodos para la determinación del peso de células secas se informan en, por ejemplo, Riesenber D. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 34:77-82, 1990.
- Los nutrientes en el medio proporcionado resultarán metabolizados durante el cultivo y deben ser repuestos con el fin de evitar una limitación. En el caso de que un aminoácido presente una solubilidad pobre sólo puede prepararse y añadirse una solución de alimentación de concentración reducida. Para proporcionar la cantidad requerida del aminoácido debe añadirse un volumen grande de la solución de alimentación. Ello resulta en un incremento del volumen de cultivo total, una dilución del caldo de cultivo y, de esta manera, resulta desventajoso para un procedimiento a alta densidad celular.

La solubilidad de los 20 aminoácidos naturales se lista en la Tabla a continuación.

Tabla

aminoácido	solubilidad en agua		Solubilidad [buena/aceptable/pobre]
	[g/l]	a [°C]	
alanina	166,5	25	buena
arginina	150	20	buena
aspartato	22	20	pobre
ácido aspártico	4	20	pobre

cisteína	280	20	buena
glutamina	26	18	pobre
ácido glutámico	11	25	pobre
glicina	225	20	buena
histidina	38	20	pobre
isoleucina	40	20	pobre
leucina	24	20	pobre
lisina	300	20	buena
metionina	48	20	pobre
fenilalanina	27	20	pobre
prolina	1500	20	buena
serina	364	20	buena
treonina	90	20	aceptable
triptófano	10	20	pobre
tirosina	0,4	20	pobre
valina	88	20	aceptable

La solubilidad de los aminoácidos aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano y tirosina es inferior a 50 g/l y, de esta manera, se considera que estos aminoácidos presentan una solubilidad pobre en agua.

5 Por ejemplo, el aminoácido leucina presenta una solubilidad en agua a 20°C de 24 g/l y, de esta manera, es pobremente soluble. En una solución alcalina que comprende 12,5% (p/v) de amonio la solubilidad se incrementa a 76 g/l y, de esta manera, presenta una solubilidad tres veces mayor en agua. Además, el volumen de alimentación requerido se reduce en más de 60%. En el caso de que simultáneamente también se utilice la solución alcalina para  
10 ajustar el valor del pH del cultivo, el volumen añadido puede reducirse todavía más. Por ejemplo, el aminoácido tirosina presenta una solubilidad en agua a 20°C de 0,4 g/l y, de esta manera, es pobremente soluble. En una solución alcalina que comprende 12,5% (p/v) de amonio la solubilidad se incrementa a 39 g/l y, de esta manera, presenta una solubilidad cien veces mayor en agua.

15 En una realización, el aminoácido es aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano y/o tirosina. En otra realización, el aminoácido es aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, histidina, leucina, triptófano y/o tirosina. En una realización, el aminoácido es la leucina. En una realización, el aminoácido es un aminoácido que es pobremente soluble en agua a un pH de aproximadamente 7 a 20°C. En otra realización, el aminoácido es leucina y prolina, o el aminoácido es leucina y  
20 prolina y triptófano. En una realización adicional, el aminoácido presenta una solubilidad en la solución alcalina que es superior a la solubilidad en agua a 20°C. En una realización adicional, la solubilidad en la solución alcalina es entre dos y diez veces la solubilidad en agua a 20°C. En una realización, el aminoácido presenta una solubilidad en agua de 40 g/l o menos. En otra realización, el aminoácido presenta una solubilidad en agua de 30 g/l o inferior. En una realización adicional, el aminoácido presenta una solubilidad en la solución alcalina de 25 g/l o superior. En una  
25 realización adicional, el aminoácido presenta una concentración en la solución alcalina de 30 g/l o superior. En otra realización, el aminoácido presenta una concentración en la solución alcalina de 35 g/l o superior. En una realización adicional, el aminoácido presenta una solubilidad en la solución alcalina de 50 g/l o superior.

30 En la Tabla a continuación, se muestran los resultados del cultivo en un recipiente de cultivo con 10 l de volumen de trabajo de la misma célula de *E. coli* auxotrófica para leucina y prolina obtenida con diferentes modos de alimentación.

Tabla

experimento	alimentación	biomasa total (materia seca) [g/l]	rendimiento de proteína recombinante [g/l]	volumen de cultivo final [l]
1	alimentaciones separadas: -20 g/l L-leucina -100 g/l L-prolina	49,4	10,0	11,8
2	alimentaciones separadas: -20 g/l L-leucina -100 g/l L-prolina	50,6	9,0	12,2
3	alimentación combinada: solución de NH <sub>3</sub> al 12,5% (p/v) que contiene 50 g/l L-leucina y 50 g/l L-prolina	75,7	16,5	10,2
4	alimentación combinada:	56,5	13,5	9,3

	solución de NH <sub>3</sub> al 12,5% (p/v) que contiene 33 g/l L-leucina y 33 g/l L-prolina			
--	---	--	--	--

Puede observarse que en los Experimentos 1 y 2, en los que se añaden dos aminoácidos como alimentaciones separadas al medio de cultivo, la biomasa total obtenida al final del cultivo y el rendimiento de proteína recombinante son más bajos que en los Experimentos 3 y 4, en los que los aminoácidos se añaden en forma de una alimentación alcalina combinada que simultáneamente se utiliza para ajustar el valor del pH del medio de cultivo. Además, el volumen de cultivo final en los Experimentos 3 y 4 no excede el volumen de trabajo del recipiente de cultivo tal como en los Experimentos 1 y 2.

En una realización, la solución alcalina es una solución de amonio al 12,5% (p/v) en agua y comprende por lo menos un aminoácido a una concentración de aproximadamente 50 g/l o superior. En una realización, la solución alcalina comprende leucina y prolina a una concentración de aproximadamente 50 g/l.

Las células procarióticas que pueden utilizarse en el método informado en la presente memoria pueden comprender una o más auxotrofias de aminoácido. Por ejemplo, las células de *E. coli* deficientes en la ruta biosintética de leucina pueden seleccionarse de entre las células deficientes en LeuB6 13-6,  $\chi$ 148,  $\chi$ 156,  $\chi$ 2224,  $\chi$ 462,  $\chi$ 463,  $\chi$ 474,  $\chi$ 478,  $\chi$ 515,  $\chi$ 65,  $\chi$ 697,  $\chi$ 760, 2000k MSE248, 342-167, 342MG, 679-680, A586, A592, A593, AA100, AA7852, AA787, AB1102, AB1111, AB1115, AB1122, AB1129, AB113, AB1132, AB1133, AB114, AB1157, AB1157-D, AB1314, AB1330, AB1331, AB1881, AB1884, AB1885, AB188, CP78, CP79, CR34 Thy-, CR34 Thy-SR, CR34/308, CR34/313, CR34/399, CR34/43, CR34/454, CR34/500, CR34/7a, CS130, CS312, CS419, CS425, CS426, CS460, CS471, CS472, CS50, CS81, CS85, CSR06, CSR603, CSR603/pDR1996, CT28-3b, DA10, DA11, DB1161, DB1257, DE1878, DE1882, DE2345, DF225, DF41, JRG94, JS10 C600r-m-, T6R, P678SSR pro-, PA20SR, PA200 SR, PA201 SR, PA214SRT6R, PA265 SR, PA309, PDE70, PA340, PA340/T6, PA360, PA414, PAM161, PAM162, PAM163, PAM164, PAM660, PAT84, PB349, PB69, PC1, PC2, PC3, PC5, PC6, PC8, PJ1, PJ2, PJ3, PJ4, PJ5, PJ C600 (= CRSR), W208 SR AzR, W2660, LAM-, W945his, WA2127, WA2379, WA2548, WA2552, WA2574, WA2899, WA921, WA946, WA960, Y10, Y46, Y53, Y70 e YYC100.

En una realización, la célula procariótica es una célula de *E. coli* K12 o una célula de *E. coli* B.

En una realización, la solución alcalina es una solución fuertemente alcalina. En otra realización, la solución alcalina presenta un valor de pH de 9 o superior, o un pH de 10 o superior o un pH de 10,5 o superior. En una realización adicional, la solubilidad del aminoácido en la solución alcalina es por lo menos el doble de la solubilidad del aminoácido en agua.

En una realización, el método para la producción de un polipéptido tal como se informa en la presente memoria comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar una célula bacteriana auxotrófica para un aminoácido, que comprende un ácido nucleico codificante del polipéptido,
- b) cultivar la célula proporcionada,
- c) ajustar el valor del pH durante el cultivo, con una solución alcalina que comprende un aminoácido para el que la célula bacteriana es auxotrófica,
- d) recuperar el polipéptido a partir de la célula o del medio de cultivo, produciendo de esta manera el polipéptido.

#### Realizaciones específicas de la invención

1. Un método para producir un polipéptido comprende las etapas de:

- a) cultivar una célula de *Escherichia coli* que comprende un ácido nucleico codificante del polipéptido,
- b) ajustar el valor del pH durante el cultivo, con una solución alcalina que comprende un aminoácido seleccionado de entre aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano y tirosina,
- c) recuperar el polipéptido a partir de la célula o del medio de cultivo, produciendo de esta manera el polipéptido, en el que el aminoácido presenta una concentración en la solución alcalina de 30 g/l o superior, y en el que la solución alcalina es una solución de amonio de 10% (p/v) o superior.

2. El método según cualquiera de las realizaciones anteriores, caracterizado porque la célula bacteriana es una célula auxotrófica para un aminoácido y la auxotrofia es para un aminoácido seleccionado de entre aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptófano y tirosina.

3. El método según cualquiera de las realizaciones anteriores, caracterizado porque la solución alcalina presenta un valor de pH de 9 o superior.

4. El método según cualquiera de las realizaciones anteriores, caracterizado porque el polipéptido es la apolipoproteína A humana o un derivado de la misma.

5. Método según la realización 4, caracterizado porque la apolipoproteína A1 presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 01 y nº 35.

6. El método según la realización 5, caracterizado porque la apolipoproteína A1 presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 01, nº 02, nº 34 y nº 35.

7. El método según cualquiera de las realizaciones anteriores, caracterizado porque el aminoácido presenta una concentración de aproximadamente 50 g/l.

8. El método según cualquiera de las realizaciones anteriores, caracterizado porque la solución alcalina es una solución de amonio de aproximadamente 12,5% (p/v) de amonio en agua.

9. El método según cualquiera de las realizaciones anteriores, caracterizado porque el aminoácido es la leucina.

10. El método según cualquiera de las realizaciones anteriores, caracterizado porque la solución alcalina comprende leucina y prolina.

11. El método según cualquiera de las realizaciones anteriores, caracterizado porque la solución alcalina es una solución de amonio de aproximadamente 12,5% (p/v) y comprende los aminoácidos leucina y prolina, cada uno a una concentración de aproximadamente 50 g/l.

Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a comprender la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1 Gráfico de parámetros Ejemplo 3 -alimentación separada de aminoácidos.

Figura 2 Gráfico de parámetros Ejemplo 3 -alimentación separada de aminoácidos.

Figura 3 Gráfico de parámetros Ejemplo 4 -alimentación combinada de aminoácidos.

Figura 4 Gráfico de parámetros Ejemplo 4 -alimentación combinada de aminoácidos.

Materiales y métodos

Se midió la densidad óptica de los cultivos con un fotómetro DR2800 (Hach-Lange, Düsseldorf, Alemania) a 578 nm.

Se determinó la concentración de proteína densitométricamente mediante la comparación de los volúmenes de una banda de una proteína estándar con los volúmenes de banda de la proteína producida en muestras de fermentación en un gel SDS-Page.

Ejemplo 1

Determinación de la solubilidad de la leucina en una solución de amonio

Se introdujo la cantidad calculada de leucina en un matraz de 500 ml. Tras la adición de 250 ml de agua desionizada, la solución se esterilizó mediante autoclavado. A continuación, se añadieron 250 ml de una solución de amonio al 25% (p/v) y se determinó si la leucina se encontraba disuelta o no. Tras la disolución de la leucina, se determinó el volumen final de la solución. En caso de que se desviase notablemente de 500 ml, se preparaba nuevamente la solución con una cantidad reducida de agua (ver la Tabla 3).

Tabla 3

Concentración de leucina [g/l]	17	18	19	20	21	25	30	40	50
Agua [ml]	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Solución de amonio [ml]	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Soluble?	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Volumen final [ml]	500	500	500	500	500	500	500	500	500

Concentración de leucina [g/l]	60	70	71	72	73	74	75	76	77
Agua [ml]	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Solución de amonio [ml]	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Soluble?	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Volumen final [ml]	500	500	500	500	500	500	500	500	500

Ejemplo 2

Preparación y descripción de los plásmidos de expresión de *E. coli*

Se preparó el polipéptido de fusión de tetranectina-apolipoproteína A-I por medios recombinantes. La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión expresado en la dirección N- a C-terminal es la siguiente:

- el aminoácido metionina (M),
- un fragmento de una secuencia de interferón que presenta la secuencia de aminoácidos CDLPQTHSL (SEC ID n° 36),
- un conector GS,
- una etiqueta hexa-histidina que presenta la secuencia de aminoácidos HHHHHH (SEC ID n° 37),
- un conector GS,
- un sitio de corte de IgA proteasa que presenta la secuencia de aminoácidos VVAPPAP (SEC ID n° 38), y
- una tetranectina-apolipoproteína A-I que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 02.

Los polipéptidos de fusión de tetranectina-apolipoproteína A-I tal como se ha indicado anteriormente son polipéptidos precursores a partir de los que se liberaron los polipéptidos de fusión de tetranectina-apolipoproteína A-I mediante corte enzimático in vitro utilizando IgA proteasa.

El gen de fusión codificante del polipéptido precursor se ensambló mediante métodos y técnicas de recombinación conocidos mediante conexión de los segmentos de ácidos nucleicos apropiados. Las secuencias de ácidos nucleicos preparadas mediante síntesis química se verificaron mediante secuenciación del ADN. El plásmido de expresión para la producción de tetranectina-apolipoproteína A-I se preparó tal como se indica a continuación.

#### Construcción del plásmido de expresión de *E. coli*

El plásmido 4980 (4980-pBRori-URA3-LACI-SAC) es un plásmido de expresión para la expresión de la estreptavidina nuclear en *E. coli*. Se generó mediante ligación del fragmento de vector EcoRI/CeIII de 3.142 pb derivado del plásmido 1966 (1966-pBRori-URA3-LACI-T-repetición, informado en la patente EP n° B 1 422 237) con un fragmento EcoRI/CeIII codificante de la estreptavidina nuclear de 435 pb de longitud.

El plásmido de expresión de *E. coli* de estreptavidina nuclear comprende los elementos siguientes:

- el origen de replicación del vector pBR322 para la replicación en *E. coli* (correspondiente a las posiciones de pb 2.517 a 3.160 según Sutcliffe J.G. et al., Quant. Biol. 43:77-90, 1979),
- el gen URA3 de *Saccharomyces cerevisiae* codificante de la orotidina 5'-fosfato descarboxilasa (Rose M. et al., Gene 29:113-124, 1984), que permite la selección de plásmido mediante complementación de las cepas mutantes *E. coli* pyrF (auxotrofia para el uracilo),
- el casete de expresión de la estreptavidina nuclear, que comprende:
- el promotor T5 híbrido (promotor híbrido T5-PN25/03/04 según Bujard H. et al., Methods Enzymol. 155:416-433, 1987, y Stueber D. et al., Immunol. Methods IV:121-152, 1990), incluyendo un sitio de unión ribosómica sintético según Stueber D. et al. (ver anteriormente),
- el gen de la estreptavidina nuclear,
- dos terminadores de transcripción derivados de bacteriófago, el terminador  $\lambda$ -T0 (Schwarz E. et al., Nature 272:410-414, 1978) y el terminador fd (Beck E. y Zink B., Gene 1-3:35-58, 1981),
- el gen represor lacI de *E. coli* (Farabaugh P.J., Nature 274:765-769, 1978).

El plásmido de expresión final para la expresión del polipéptido precursor de tetranectina-apolipoproteína A-I se preparó cortando el gen estructural de la estreptavidina nuclear del vector 4980 utilizando el sitio de corte único por endonucleasa de restricción EcoRI y CeIII e insertando el ácido nucleico flanqueado por el sitio de restricción EcoRII/CeIII codificante del polipéptido precursor en el fragmento de vector EcoRI/CeIII-4980 de 3.142 pb de longitud.

#### Ejemplo 3

##### Alimentación de leucina y prolina como soluciones separadas

En el presente ejemplo de referencia se llevó a cabo el cultivo de una cepa de *E. coli* auxotrófica mediante un método de cultivo de alta densidad celular tal como se informa en Rosenberg et al. (1991, *supra*) en combinación con la alimentación separada de los aminoácidos L-leucina y L-prolina.

Se utilizó la cepa *E. coli* K12 CSPZ-2 (leuB, proC, trpE, th-1,  $\Delta$ pyrF). La cepa se transformó con un plásmido de expresión para la producción de una proteína terapéutica y se mantuvo como banco de inóculo primario en ampollas que contenían 1 ml de la cepa cultivada en medio de precultivo definido hasta una densidad óptica (determinada a 578 nm) de aproximadamente 1 y 1 ml de glicerol al 85% (v/v) y se almacenó a -80°C.

El medio de precultivo definido era un medio M9 según Sambrook J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) complementado con

1,0 g/l de L-leucina,



1,0 g/l de L-prolina y  
1,0 mg/l de tiamina-HCl.

Para la fermentación, se utilizó un medio de lote según Riesenberget al. (1991, *supra*):

- 5 27,6 g/l de glucosa,  
13,3 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  
4,0 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  
1,7 g/l de citrato,  
10 1,2 g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  
60 mg/l de citrato de hierro (III),  
2,5 mg/l de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  
15 mg/l de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  
1,5 mg/l de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  
3 mg/l de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  
15 2,5 mg/l de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
8 mg/l de  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  
8,4 mg/l de Titriplex III, y  
1,3 ml/l de agente antiespumante Synperonic al 10%.

- 20 El medio del lote se complementó con:  
5,4 mg/l de tiamina-HCl, y  
1,2 g/l de L-leucina y L-prolina- respectivamente.

- 25 La solución de alimentación 1 contenía:  
700 g/l de glucosa y  
19,7 g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

- 30 La solución de alimentación 2 contenía:  
20 g/l de L-leucina.

- La solución de alimentación 3 contenía:  
100 g/l de L-prolina.

- 35 Se prepararon las alimentaciones 2 y 3 introduciendo una cantidad medida del aminoácido, disolviendo el aminoácido en agua y autoclavando la solución. A continuación, se determinó que el valor del pH de la solución era de aproximadamente 6,15 para la alimentación 2 y de aproximadamente 6,43 para la alimentación 3.

La solución alcalina utilizada para la regulación del pH fue una solución acuosa de  $\text{NH}_3$  al 12,5% (p/v).

- 40 Todos los componentes se disolvieron en agua desionizada.

Para el precultivo, en 300 ml de medio M9 en un matraz Erlenmeyer de 1.000 ml con 3 deflectores se inocularon 2 ml de ampolla de banco de inóculo primario. El cultivo se llevó a cabo en un agitador rotatorio durante 13 horas a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (determinada a 578 nm) de entre 1 y 3.

- 45 La fermentación principal se llevó a cabo en un fermentador Biostat C DCU3 de 10 l (Sartorius, Melsungen, Alemania). Partiendo de 6,4 l de medio de lote estéril más 300 ml de precultivo, se llevó a cabo la fermentación por lotes a 37°C, pH  $6,9 \pm 0,2$ , 500 mbar y una tasa de aireación de 10 l/min. Tras agotarse la glucosa inicialmente añadida, la temperatura se modificó a 28°C y la fermentación entró en el modo por lotes alimentados manteniendo el oxígeno disuelto ( $\text{pO}_2$ ) al 50% (DOstat, ver, por ejemplo, Shay L.K. et al. (1987, *infra*)) y mediante la adición de la alimentación 1 en combinación con una velocidad de agitación en constante incremento (550 rpm a 1.000 rpm en 10 horas y de 1.000 rpm a 1.400 rpm en 16 horas) y una tasa de aireación en constante incremento (de 10 l/min. a 16 l/min. en 10 horas y de 16 l/min. a 20 l/min. en 5 horas). El suministro de aminoácidos adicionales se inició al alcanzar el pH el límite de regulación inferior, es decir, pH 6,70, con la adición de la alimentación 2 (iniciándose con 33,8 ml/h durante 14 horas e incrementándose después hasta 97,6 ml/h) y la alimentación 3 (iniciándose con 6,8 ml/h durante 14 horas e incrementándose después hasta 19,5 ml/h). Los caudales se calcularon a partir de una fermentación separada (ver el Ejemplo 4), para aplicar exactamente la misma cantidad de aminoácidos a los cultivos con independencia de la estrategia de alimentación. Se indujo la expresión de proteína terapéutica recombinante mediante la adición de IPTG 1 mM a una densidad óptica de 70.

- 60 Los gráficos de parámetros de dicha fermentación se muestran en las figuras 1 y 2.

- Tras la inoculación, seguida de una etapa de latencia corta, las células crecían a una tasa de crecimiento específico máxima de  $\mu_{\text{max}}=0,30$  l/h. Tras 8 horas de cultivo, se alcanzó el límite de regulación de pH inferior y se controló el pH a 6,70 con la adición de una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 12,5%. Simultáneamente se inició la alimentación de aminoácido

- mediante la adición de las alimentaciones 2 y 3. Tras 16 horas, se había consumido la glucosa, indicado por el acusado incremento del valor de  $pO_2$ . En este tiempo se modificó la temperatura del cultivo de 37°C a 28°C. Tras 15 minutos adicionales, se inició el control  $pO_2$ -alimentación y se controló la  $pO_2$  a 50% mediante la adición de la alimentación 1, incrementando continuamente la agitación y la tasa de aireación hasta los máximos respectivos, de 1.400 rpm y 20 l/min. Se redujo continuamente la tasa de crecimiento de 0,15 hasta aproximadamente 0,05 l/h. Concomitantemente, se redujo en etapas la velocidad del agitador tras 36 horas de cultivo. Una vez ya no pudo determinarse ningún incremento más de la densidad óptica, se terminó la fermentación y se enfriaron las células bacterianas a 4°C durante la noche, antes de la recolección.
- 10 Al final de la fermentación el rendimiento de biomasa total era de 49,4 g/l (materia seca). Durante la fermentación prácticamente no se excretó acetato, aunque hacia el final las concentraciones se incrementaron acusadamente hasta 7 g/l. La formación de proteína recombinante rindió 9,96 g/l. El volumen de caldo de cultivo excedía el volumen de trabajo normal del fermentador y se incrementó a 11,8 l.
- 15 Se repitió la fermentación, resultando en una densidad óptica final de 130, un rendimiento de biomasa final de 50,6 g/l y un rendimiento de proteína recombinante de 9,0 g/l; el volumen del caldo de cultivo al final de la fermentación era de 12,2 l.

#### Ejemplo 4

- 20 Alimentación de leucina y prolina incorporada en la solución de álcali para la regulación del pH

En la presente fermentación se incorporó la alimentación de aminoácido en la solución alcalina de control del pH. La base de dicha fermentación era el mismo método de cultivo a alta densidad celular según Riesenberg et al. (1991, *supra*) tal como se utiliza en el Ejemplo 3. Se incorporaron los aminoácidos L-leucina y L-prolina en la solución acuosa de  $NH_3$  al 12,5% y se alimentó con adición de álcali durante el control del pH.

Se utilizó la cepa *E. coli* K12 CSPZ-2 (leuB, proC, trpE, th-1,  $\Delta$ pyrF). La cepa se transformó con un plásmido de expresión para la producción de una proteína terapéutica y se mantuvo como banco de inóculo primario en ampollas que contenían 1 ml de la cepa cultivada en medio de precultivo definido hasta una densidad óptica (determinada a 578 nm) de aproximadamente 1 y 1 ml de glicerol al 85% (v/v) y se almacenó a -80°C.

El medio de precultivo definido era un medio M9 según Sambrook J. et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) complementado con:

- 35 1,0 g/l de L-leucina,  
1,0 g/l de L-prolina, y  
1,0 mg/l de tiamina-HCl.

40 Para la fermentación, se utilizó un medio de lote según Riesenberg et al. (1991, *supra*):

- 45 27,6 g/l de glucosa,  
13,3 g/l de  $KH_2PO_4$ ,  
4,0 g/l de  $(NH_4)_2HPO_4$ ,  
1,7 g/l de citrato,  
1,2 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  
60 mg/l de citrato de hierro (III),  
2,5 mg/l de  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  
15 mg/l de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  
50 1,5 mg/l de  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  
3 mg/l de  $H_3BO_3$ ,  
2,5 mg/l de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$   
8 mg/l de  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ,  
8,4 mg/l de Titriplex III, y  
55 1,3 ml/l de agente antiespumante Synperonic al 10%.

El medio de lote se complementó con:

- 60 5,4 mg/l de tiamina-HCl y  
1,2 g/l de L-leucina y L-prolina, respectivamente.

La solución de alimentación 1 contenía:

- 700 g/l de glucosa y  
19,7 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .

La solución alcalina utilizada para la regulación del pH fue una solución acuosa de NH<sub>3</sub> al 12,5% (p/v) complementada con 50 g/l de L-leucina y 50 g/l de L-prolina, respectivamente.

Todos los componentes se disolvieron en agua desionizada.

5 La fermentación principal se llevó a cabo en un fermentador Biostat C DCU3 de 10 l (Sartorius, Melsungen, Alemania). Partiendo de 6,4 l de medio de lote estéril más 300 ml de precultivo, se llevó a cabo la fermentación por lotes a 37°C, pH 6,9 ± 0,2, 500 mbar y una tasa de aireación de 10 l/min. Tras agotarse la glucosa inicialmente añadida, la temperatura se modificó a 28°C y la fermentación entró en el modo por lotes alimentados manteniendo el oxígeno disuelto (pO<sub>2</sub>) al 50% (DOstat, ver, por ejemplo, Shay L.K. et al. (Shay L.K. et al., J. Indus. Microbiol. 2:79-85, 1987)) y mediante la adición de la alimentación 1 en combinación con una velocidad de agitación en constante incremento (550 rpm a 1.000 rpm en 10 horas y de 1.000 rpm a 1.400 rpm en 16 horas) y una tasa de aireación en constante incremento (de 10 l/min. a 16 l/min. en 10 horas y de 16 l/min. a 20 l/min. en 5 horas). El suministro de aminoácidos adicionales resultó de la adición de álcali al alcanzar el pH el límite de regulación inferior, pH 6,70. A partir del curso temporal de adición de álcali, se calcularon los caudales para las alimentaciones 2 y 3 en el Ejemplo 2, a fin de aplicar exactamente la misma cantidad de aminoácidos a los cultivos con independencia de la estrategia de alimentación. Se indujo la expresión de proteína terapéutica recombinante mediante la adición de IPTG 1 mM a una densidad óptica de 70.

20 Los gráficos de parámetros típicos de dicha fermentación se muestran en las figuras 3 y 4.

Tras la inoculación, seguida de una etapa de latencia corta, las células crecían a una tasa de crecimiento específico máxima de  $\mu_{max}=0,30$  l/h. Tras 8 horas de cultivo, se alcanzó el límite de regulación de pH inferior y se controló el pH a 6,70 con la adición de una solución de NH<sub>3</sub> al 12,5% complementada con 50 g/l de L-leucina y 50 g/l de L-prolina, respectivamente. Lo anterior inició simultáneamente la alimentación de aminoácido. Tras 16 horas se había consumido la glucosa proporcionada. En este tiempo se modificó la temperatura del cultivo de 37°C a 28°C. Tras 15 minutos adicionales, se inició el control pO<sub>2</sub>-alimentación y se controló la pO<sub>2</sub> a 50% mediante la adición de la alimentación 1, incrementando continuamente la agitación y la tasa de aireación hasta los máximos respectivos, de 1.400 rpm y 20 l/min. Se redujo continuamente la tasa de crecimiento de 0,15 hasta aproximadamente 0,05 l/h. Una vez ya no se podía detectar ningún incremento adicional de la densidad óptica, se terminó la fermentación y se enfriaron las células bacterianas a 4°C durante la noche, antes de la recolección.

Al final de la fermentación la densidad óptica era de 169 y el rendimiento de biomasa total era de 75,7 g/l (materia seca). Durante la fermentación prácticamente no se excretó acetato y hacia el final las concentraciones se elevaron a 1 g/l. La formación de proteína recombinante rindió 16,5 g/l. El volumen del caldo de cultivo era de 10,2 l.

Se repitió la fermentación con diferentes cantidades de aminoácidos disueltos en la solución de álcali (33 g/l de L-leucina y L-prolina). La cantidad de aminoácidos alimentados era inferior y resultó en una densidad óptica de 145, un rendimiento de biomasa final de 56,5 g/l y un rendimiento de proteína recombinante de 13,5 g/l; el volumen del caldo de cultivo al final de la fermentación era de 9,3 l.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> F. Hoffmann-La Roche AG  
 <120> Alimentación alcalina  
 <130> 26775 WO  
 50 <150> EP10008997.8  
 <151> 2010-08-30  
 <160> 38  
 55 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 285  
 <212> PRT  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Tetranectina-apolipoproteína A-I (1)  
 65 <400> 1

ES 2 558 751 T3

Ala Pro Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe  
1 5 10 15

Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu  
20 25 30

Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Asp Glu Pro Pro Gln Ser  
35 40 45

Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu  
50 55 60

Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu  
65 70 75 80

Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr  
85 90 95

Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu  
100 105 110

Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met  
115 120 125

Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp  
130 135 140

Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys  
145 150 155 160  
Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu  
165 170 175

His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp  
180 185 190

Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr  
195 200 205

Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys  
210 215 220

Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu  
225 230 235 240

His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu  
245 250 255

Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu  
260 265 270

Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln  
275 280 285

ES 2 558 751 T3

<210> 2

<211> 283

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Tetranectina-apolipoproteína A-I (2)

10 <400> 2

```

Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu
1          5          10          15

Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys
          20          25          30

Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp
          35          40          45

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp
          50          55          60

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
65          70          75          80

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr
          85          90          95
    
```

ES 2 558 751 T3

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp  
 100 105 110

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys  
 115 120 125

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe  
 130 135 140

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu  
 145 150 155 160

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu  
 165 170 175

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala  
 180 185 190

Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp  
 195 200 205

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn  
 210 215 220

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu  
 225 230 235 240

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln  
 245 250 255

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala  
 260 265 270

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln  
 275 280

<210> 3

<211> 22

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> mimético de apolipoproteína A-I (1)

10

<400> 3

Pro Val Leu Asp Glu Phe Arg Glu Lys Leu Asn Glu Glu Leu Glu Ala  
 1 5 10 15

Leu Lys Gln Lys Leu Lys  
 20

<210> 4  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> mimético de apolipoproteína A-I (2)

10 <400> 4

Pro Val Leu Asp Leu Phe Arg Glu Leu Leu Asn Glu Leu Leu Glu Ala  
 1 5 10 15

Leu Lys Gln Lys Leu Lys  
 20

<210> 5  
 15 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

20 Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp  
 20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp  
 35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys  
 50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr  
 65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp  
 85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys  
 100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe  
 115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu  
 130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu  
 145 150 155 160

ES 2 558 751 T3

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala  
 165 170 175

Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp  
 180 185 190

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn  
 195 200 205

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu  
 210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln  
 225 230 235 240

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala  
 245 250 255

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln  
 260 265

<210> 6  
 <211> 100  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

Met Lys Leu Leu Ala Ala Thr Val Leu Leu Leu Thr Ile Cys Ser Leu  
 1 5 10 15

Glu Gly Ala Leu Val Arg Arg Gln Ala Lys Glu Pro Cys Val Glu Ser  
 20 25 30

Leu Val Ser Gln Tyr Phe Gln Thr Val Thr Asp Tyr Gly Lys Asp Leu  
 35 40 45

Met Glu Lys Val Lys Ser Pro Glu Leu Gln Ala Glu Ala Lys Ser Tyr  
 50 55 60

Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys Lys Ala Gly  
 65 70 75 80

Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu Gly Thr Gln  
 85 90 95

Pro Ala Thr Gln  
 100

10  
 <210> 7  
 <211> 396



ES 2 558 751 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

5

```

Met Phe Leu Lys Ala Val Val Leu Thr Leu Ala Leu Val Ala Val Ala
 1          5          10          15

Gly Ala Arg Ala Glu Val Ser Ala Asp Gln Val Ala Thr Val Met Trp
 20          25          30

Asp Tyr Phe Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ala Lys Glu Ala Val Glu His
 35          40          45

Leu Gln Lys Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Asn Ala Leu Phe Gln Asp
 50          55          60

Lys Leu Gly Glu Val Asn Thr Tyr Ala Gly Asp Leu Gln Lys Lys Leu
 65          70          75          80

Val Pro Phe Ala Thr Glu Leu His Glu Arg Leu Ala Lys Asp Ser Glu
 85          90          95

Lys Leu Lys Glu Glu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Glu Leu Arg Ala Arg
 100         105         110

Leu Leu Pro His Ala Asn Glu Val Ser Gln Lys Ile Gly Asp Asn Leu
 115         120         125

Arg Glu Leu Gln Gln Arg Leu Glu Pro Tyr Ala Asp Gln Leu Arg Thr
 130         135         140

Gln Val Asn Thr Gln Ala Glu Gln Leu Arg Arg Gln Leu Thr Pro Tyr
 145         150         155         160

Ala Gln Arg Met Glu Arg Val Leu Arg Glu Asn Ala Asp Ser Leu Gln
 165         170         175

Ala Ser Leu Arg Pro His Ala Asp Glu Leu Lys Ala Lys Ile Asp Gln
 180         185         190

Asn Val Glu Glu Leu Lys Gly Arg Leu Thr Pro Tyr Ala Asp Glu Phe
 195         200         205

Lys Val Lys Ile Asp Gln Thr Val Glu Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala
 210         215         220

Pro Tyr Ala Gln Asp Thr Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Leu Glu Gly
 225         230         235         240
    
```

ES 2 558 751 T3

Leu Thr Phe Gln Met Lys Lys Asn Ala Glu Glu Leu Lys Ala Arg Ile  
 245 250 255

Ser Ala Ser Ala Glu Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Pro Leu Ala Glu  
 260 265 270

Asp Val Arg Gly Asn Leu Arg Gly Asn Thr Glu Gly Leu Gln Lys Ser  
 275 280 285

Leu Ala Glu Leu Gly Gly His Leu Asp Gln Gln Val Glu Glu Phe Arg  
 290 295 300

Arg Arg Val Glu Pro Tyr Gly Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln  
 305 310 315 320

Gln Met Glu Gln Leu Arg Gln Lys Leu Gly Pro His Ala Gly Asp Val  
 325 330 335

Glu Gly His Leu Ser Phe Leu Glu Lys Asp Leu Arg Asp Lys Val Asn  
 340 345 350

Ser Phe Phe Ser Thr Phe Lys Glu Lys Glu Ser Gln Asp Lys Thr Leu  
 355 360 365

Ser Leu Pro Glu Leu Glu Gln Gln Glu Gln Gln Glu Gln Gln  
 370 375 380

Gln Glu Gln Val Gln Met Leu Ala Pro Leu Glu Ser  
 385 390 395

<210> 8  
 <211> 366  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 8

Met Ala Ser Met Ala Ala Val Leu Thr Trp Ala Leu Ala Leu Leu Ser  
 1 5 10 15

Ala Phe Ser Ala Thr Gln Ala Arg Lys Gly Phe Trp Asp Tyr Phe Ser  
 20 25 30

Gln Thr Ser Gly Asp Lys Gly Arg Val Glu Gln Ile His Gln Gln Lys  
 35 40 45

Met Ala Arg Glu Pro Ala Thr Leu Lys Asp Ser Leu Glu Gln Asp Leu  
 50 55 60

10

ES 2 558 751 T3

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

ES 2 558 751 T3

325

330

335

Leu Ser Lys Leu Gln Ala Arg Leu Asp Asp Leu Trp Glu Asp Ile Thr  
 340 345 350

His Ser Leu His Asp Gln Gly His Ser His Leu Gly Asp Pro  
 355 360 365

<210> 9

<211> 267

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp  
 20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp  
 35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys  
 50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr  
 65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp  
 85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys  
 100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe  
 115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu  
 130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu  
 145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala  
 165 170 175

Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp  
 180 185 190

10

ES 2 558 751 T3

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn  
 195 200 205

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu  
 210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln  
 225 230 235 240

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala  
 245 250 255

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln  
 260 265

<210> 10  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10

5

Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp  
 20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp  
 35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys  
 50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr  
 65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp  
 85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys  
 100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe  
 115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu  
 130 135 140

10

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu



ES 2 558 751 T3

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe  
 115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu  
 130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu His Glu Gly Thr Arg Gln Lys Leu His Glu  
 145 150 155 160

Leu His Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Val Arg Asp Arg Ala  
 165 170 175

Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp  
 180 185 190

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn  
 195 200 205

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Ser Glu His Leu  
 210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln  
 225 230 235 240

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala  
 245 250 255

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Ser Thr Gln  
 260 265

<210> 12  
 <211> 265  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Lys Ala Val Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Asp Pro Gln Ser Ser Trp Asp  
 20 25 30

Arg Val Lys Asp Phe Ala Thr Val Tyr Val Glu Ala Ile Lys Asp Ser  
 35 40 45

Gly Arg Asp Tyr Val Ala Gln Phe Glu Ala Ser Ala Leu Gly Lys Gln  
 50 55 60

10 Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Thr Leu Ala Ser Thr Leu





ES 2 558 751 T3

Val Lys Asp Phe Ala Thr Val Tyr Val Asp Ala Ile Lys Asp Ser Gly  
 35 40 45

Arg Asp Tyr Val Ala Gln Phe Glu Ala Ser Ala Leu Gly Lys His Leu  
 50 55 60

Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Leu Gly Ser Thr Phe Thr  
 65 70 75 80

Lys Val Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn  
 85 90 95

Leu Glu Lys Glu Thr Glu Ala Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu  
 100 105 110

Glu Glu Val Lys Lys Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Asn  
 115 120 125

Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Thr Tyr Arg Gln Lys Met Ala Pro Leu  
 130 135 140

Gly Ala Glu Phe Arg Glu Gly Ala Arg Gln Lys Val Gln Glu Leu Gln  
 145 150 155 160

Glu Lys Leu Ser Pro Leu Ala Glu Glu Leu Arg Asp Arg Leu Arg Ala  
 165 170 175

His Val Glu Ala Leu Arg Gln His Val Ala Pro Tyr Ser Asp Asp Leu  
 180 185 190

Arg Gln Arg Met Ala Ala Arg Phe Glu Ala Leu Lys Glu Gly Gly Gly  
 195 200 205

Ser Leu Ala Glu Tyr Gln Ala Lys Ala Gln Glu Gln Leu Lys Ala Leu  
 210 215 220

Gly Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu  
 225 230 235 240

Pro Val Leu Glu Asn Leu Lys Val Ser Ile Leu Ala Ala Ile Asp Glu  
 245 250 255

Ala Ser Lys Lys Leu Asn Ala Gln  
 260

<210> 14  
 <211> 266  
 <212> PRT

ES 2 558 751 T3

<213> Homo sapiens

<400> 14

```

Met Lys Ala Ala Leu Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
 1          5          10          15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Gln Ser Pro Trp Asp
 20          25          30

Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Ala Val Lys Asp Ser
 35          40          45

Gly Arg Asp Tyr Val Ala Gln Phe Glu Ala Ser Ala Leu Gly Lys Gln
 50          55          60

Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Leu Ser Ser Thr Val
 65          70          75          80

Thr Lys Leu Arg Glu Gln Ile Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp
 85          90          95

Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Val Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp
 100         105         110

Leu Glu Glu Val Lys Gln Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln
 115         120         125

Lys Lys Trp Gln Glu Glu Val Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Ala Pro
 130         135         140

Leu Gly Ser Glu Leu Arg Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu Gln Glu Leu
 145         150         155         160

Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Ala Glu Glu Leu Arg Asp Arg Ala Arg
 165         170         175

Thr His Val Asp Ala Leu Arg Ala Gln Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Asp
 180         185         190

Leu Arg Glu Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Gly Gly
 195         200         205

Gly Ala Ser Leu Ala Glu Tyr His Ala Arg Ala Ser Glu Gln Leu Ser
 210         215         220

Ala Leu Gly Glu Lys Ala Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly
 225         230         235         240

Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Leu Leu Ala Ala Ile
 245         250         255
      Asp Glu Ala Thr Lys Lys Leu Asn Ala Gln
      260         265

```

5

ES 2 558 751 T3

<210> 15  
 <211> 206  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<400> 15

Met Lys Ala Val Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Arg Asp Glu Pro Arg Ser Ser Trp Asp  
 20 25 30

Lys Ile Lys Asp Phe Ala Thr Val Tyr Val Asp Thr Val Lys Asp Ser  
 35 40 45

Gly Arg Glu Tyr Val Ala Gln Phe Glu Ala Ser Ala Phe Gly Lys Gln  
 50 55 60

Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Leu Ser Ser Thr Val  
 65 70 75 80

Ser Lys Leu Gln Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp  
 85 90 95

Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Glu Glu Met Asn Lys Asp  
 100 105 110

Leu Gln Glu Val Arg Gln Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Glu Phe Gln  
 115 120 125

Lys Lys Trp Gln Glu Glu Val Glu Arg Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro  
 130 135 140

Leu Gly Ala Glu Leu Arg Glu Ser Ala Arg Gln Lys Leu Thr Glu Leu  
 145 150 155 160

Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Ala Glu Glu Leu Arg Asp Ser Ala Arg  
 165 170 175

Thr His Val Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Ala Ser Val  
 180 185 190

Gln Asn Val Leu Asp Glu Ala Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln  
 195 200 205

10

<210> 16  
 <211> 265

ES 2 558 751 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

5

```

Met Lys Ala Val Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
 1          5          10          15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Gln Ser Ser Trp Asp
 20          25          30

Arg Val Arg Asp Leu Ala Asn Val Tyr Val Asp Ala Val Lys Glu Ser
 35          40          45

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

Leu Asn Leu Lys Leu Val Asp Asn Trp Asp Thr Leu Gly Ser Thr Phe
 65          70          75          80

Gln Lys Val His Glu His Leu Gly Pro Val Ala Gln Glu Phe Trp Glu
 85          90          95

Lys Leu Glu Lys Glu Thr Glu Glu Leu Arg Arg Glu Ile Asn Lys Asp
 100         105         110

Leu Glu Asp Val Arg Gln Lys Thr Gln Pro Phe Leu Asp Glu Ile Gln
 115         120         125

Lys Lys Trp Gln Glu Asp Leu Glu Arg Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro
 130         135         140

Leu Ser Ala Gln Leu Arg Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu Met Glu Leu
 145         150         155         160

Gln Glu Gln Val Thr Pro Leu Gly Glu Asp Leu Arg Asp Ser Val Arg
 165         170         175

Ala Tyr Ala Asp Thr Leu Arg Thr Gln Leu Ala Pro Tyr Ser Glu Gln
 180         185         190

Met Arg Lys Thr Leu Gly Ala Arg Leu Glu Ala Ile Lys Glu Gly Gly
 195         200         205

Ser Ala Ser Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Ser Glu Gln Leu Ser
 210         215         220

Ala Leu Gly Glu Lys Ala Lys Pro Val Leu Glu Asp Ile His Gln Gly
 225         230         235         240
  
```

ES 2 558 751 T3

Leu Met Pro Met Trp Glu Ser Phe Lys Thr Gly Val Leu Asn Val Ile  
 245 250 255

Asp Glu Ala Ala Lys Lys Leu Thr Ala  
 260 265

<210> 17  
 <211> 264  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Met Lys Ala Val Val Leu Ala Val Ala Leu Val Phe Leu Thr Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Ala Trp His Val Trp Gln Gln Asp Glu Pro Gln Ser Gln Trp Asp  
 20 25 30

Lys Val Lys Asp Phe Ala Asn Val Tyr Val Asp Ala Val Lys Asp Ser  
 35 40 45

Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Ser Ser Ser Leu Gly Gln Gln  
 50 55 60

Leu Asn Leu Asn Leu Leu Glu Asn Trp Asp Thr Leu Gly Ser Thr Val  
 65 70 75 80

Ser Gln Leu Gln Glu Arg Leu Gly Pro Leu Thr Arg Asp Phe Trp Asp  
 85 90 95

Asn Leu Glu Lys Glu Thr Asp Trp Val Arg Gln Glu Met Asn Lys Asp  
 100 105 110

Leu Glu Glu Val Lys Gln Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Glu Phe Gln  
 115 120 125

Lys Lys Trp Lys Glu Asp Val Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Ala Pro  
 130 135 140

Leu Gly Ala Glu Leu Gln Glu Ser Ala Arg Gln Lys Leu Gln Glu Leu  
 145 150 155 160

Gln Gly Arg Leu Ser Pro Val Ala Glu Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg  
 165 170 175

Thr His Val Asp Ser Leu Arg Thr Gln Leu Ala Pro His Ser Glu Gln  
 180 185 190

10

ES 2 558 751 T3

Met Arg Glu Ser Leu Ala Gln Arg Leu Ala Glu Leu Lys Ser Asn Pro  
 195 200 205

Thr Leu Asn Glu Tyr His Thr Arg Ala Lys Thr His Leu Lys Thr Leu  
 210 215 220

Gly Glu Lys Ala Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg His Ser Leu Met  
 225 230 235 240

Pro Met Leu Glu Thr Leu Lys Thr Lys Ala Gln Ser Val Ile Asp Lys  
 245 250 255

Ala Ser Glu Thr Leu Thr Ala Gln  
 260

<210> 18  
 <211> 259  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 18

Met Lys Ala Ala Val Leu Ala Val Ala Leu Val Phe Leu Thr Gly Cys  
 1 5 10 15

Gln Ala Trp Glu Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Gln Ser Gln Trp Asp  
 20 25 30

Arg Val Lys Asp Phe Ala Thr Val Tyr Val Asp Ala Val Lys Asp Ser  
 35 40 45

Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Ser Ser Thr Leu Gly Lys Gln  
 50 55 60

Leu Asn Leu Asn Leu Leu Asp Asn Trp Asp Thr Leu Gly Ser Thr Val  
 65 70 75 80

Gly Arg Leu Gln Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Ala  
 85 90 95

Asn Leu Glu Lys Glu Thr Asp Trp Leu Arg Asn Glu Met Asn Lys Asp  
 100 105 110

Leu Glu Asn Val Lys Gln Lys Met Gln Pro His Leu Asp Glu Phe Gln  
 115 120 125

Glu Lys Trp Asn Glu Glu Val Glu Ala Tyr Arg Gln Lys Leu Glu Pro  
 130 135 140

Leu Gly Thr Glu Leu His Lys Asn Ala Lys Glu Met Gln Arg His Leu  
 145 150 155 160

10

ES 2 558 751 T3

Lys Val Val Ala Glu Glu Phe Arg Asp Arg Met Arg Val Asn Ala Asp  
 165 170 175

Ala Leu Arg Ala Lys Phe Gly Leu Tyr Ser Asp Gln Met Arg Glu Asn  
 180 185 190

Leu Ala Gln Arg Leu Thr Glu Ile Arg Asn His Pro Thr Leu Ile Glu  
 195 200 205

Tyr His Thr Lys Ala Gly Asp His Leu Arg Thr Leu Gly Glu Lys Ala  
 210 215 220

Lys Pro Ala Leu Asp Asp Leu Gly Gln Gly Leu Met Pro Val Leu Glu  
 225 230 235 240

Ala Trp Lys Ala Lys Ile Met Ser Met Ile Asp Glu Ala Lys Lys Lys  
 245 250 255

Leu Asn Ala

<210> 19  
 <211> 241  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Asp Glu Ala Lys Ser Tyr Trp Asp Gln Ile Lys Asp Met Leu Thr Val  
 1 5 10 15

Tyr Val Asp Thr Ala Lys Asp Ser Gly Lys Asp Tyr Leu Thr Ser Leu  
 20 25 30

Asp Thr Ser Ala Leu Gly Gln Gln Leu Asn Lys Lys Leu Ala Asp Asn  
 35 40 45

Trp Asp Thr Val Ser Ser Ala Leu Leu Lys Ala Arg Glu Gln Met Lys  
 50 55 60

Pro Ile Ala Met Glu Phe Trp Gly Asn Leu Glu Lys Asp Thr Glu Gly  
 65 70 75 80

Leu Arg Gln Thr Val Ser Lys Asp Leu Glu Leu Val Lys Glu Lys Val  
 85 90 95

Gln Pro Tyr Leu Asp Ser Phe Gln Lys Lys Val Glu Glu Glu Leu Glu  
 100 105 110

10

ES 2 558 751 T3

Leu Tyr Arg Gln Lys Val Ala Pro Leu Ser Ala Glu Trp Arg Glu Gln  
 115 120 125

Ala Arg Gln Lys Ala Gln Glu Leu Gln Gln Lys Ala Gly Glu Leu Gly  
 130 135 140

Gln Gln His Arg Asp Arg Val Arg Thr His Val Asp Ala Leu Arg Thr  
 145 150 155 160

Asp Leu Ala Pro Tyr Gly Glu Glu Ala Arg Lys Leu Leu Leu Gln Arg  
 165 170 175

Leu Gln Asp Ile Lys Ala Lys Ser Gly Asp Leu Ala Glu Tyr Gln Thr  
 180 185 190

Lys Leu Ser Glu His Leu Lys Ser Phe Gly Glu Lys Ala Gln Pro Thr  
 195 200 205

Leu Gln Asp Leu Arg His Gly Leu Glu Pro Leu Trp Glu Gly Ile Lys  
 210 215 220

Ala Gly Ala Met Ser Met Leu Glu Glu Leu Gly Lys Lys Leu Asn Ser  
 225 230 235 240

Gln

<210> 20

<211> 264

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Arg Gly Val Leu Val Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Thr  
 1 5 10 15

Gln Ala Arg Ser Phe Trp Gln His Asp Glu Pro Gln Thr Pro Leu Asp  
 20 25 30

Arg Ile Arg Asp Met Val Asp Val Tyr Leu Glu Thr Val Lys Ala Ser  
 35 40 45

Gly Lys Asp Ala Ile Ala Gln Phe Glu Ser Ser Ala Val Gly Lys Gln  
 50 55 60

Leu Asp Leu Lys Leu Ala Asp Asn Leu Asp Thr Leu Ser Ala Ala Ala  
 65 70 75 80

Ala Lys Leu Arg Glu Asp Met Ala Pro Tyr Tyr Lys Glu Val Arg Glu  
 85 90 95

10



ES 2 558 751 T3

Met Trp Leu Lys Asp Thr Glu Ala Leu Arg Ala Glu Leu Thr Lys Asp  
 100 105 110

Leu Glu Glu Val Lys Glu Lys Ile Arg Pro Phe Leu Asp Gln Phe Ser  
 115 120 125

Ala Lys Trp Thr Glu Glu Leu Glu Gln Tyr Arg Gln Arg Leu Thr Pro  
 130 135 140

Val Ala Gln Glu Leu Lys Glu Leu Thr Lys Gln Lys Val Glu Leu Met  
 145 150 155 160

Gln Ala Lys Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Ala Arg Asp Arg Leu Arg  
 165 170 175

Gly His Val Glu Glu Leu Arg Lys Asn Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu  
 180 185 190

Leu Arg Gln Lys Leu Ser Gln Lys Leu Glu Glu Ile Arg Glu Lys Gly  
 195 200 205

Ile Pro Gln Ala Ser Glu Tyr Gln Ala Lys Val Met Glu Gln Leu Ser  
 210 215 220

Asn Leu Arg Glu Lys Met Thr Pro Leu Val Gln Glu Phe Arg Glu Arg  
 225 230 235 240

Leu Thr Pro Tyr Ala Glu Asn Leu Lys Asn Arg Leu Ile Ser Phe Leu  
 245 250 255

Asp Glu Leu Gln Lys Ser Val Ala  
 260

5 <210> 21  
 <211> 264  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 21

Met Arg Gly Val Leu Val Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Thr  
 1 5 10 15

Gln Ala Arg Ser Phe Trp Gln His Asp Asp Pro Gln Thr Pro Leu Asp  
 20 25 30

Arg Ile Arg Asp Met Leu Asp Val Tyr Leu Glu Thr Val Lys Ala Ser  
 35 40 45

ES 2 558 751 T3

Gly Lys Asp Ala Ile Ser Gln Phe Glu Ser Ser Ala Val Gly Lys Gln  
50 55 60

Leu Asp Leu Lys Leu Ala Asp Asn Leu Asp Thr Leu Ser Ala Ala Ala  
65 70 75 80

Ala Lys Leu Arg Glu Asp Met Thr Pro Tyr Tyr Arg Glu Val Arg Glu  
85 90 95

Met Trp Leu Lys Asp Thr Glu Ala Leu Arg Ala Glu Leu Thr Lys Asp  
100 105 110

Leu Glu Glu Val Lys Glu Lys Ile Arg Pro Phe Leu Asp Gln Phe Ser  
115 120 125

Ala Lys Trp Thr Glu Glu Val Glu Gln Tyr Arg Gln Arg Leu Ala Pro  
130 135 140

Val Ala Gln Glu Leu Lys Asp Leu Thr Lys Gln Lys Val Glu Leu Met  
145 150 155 160

Gln Ala Lys Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Val Arg Asp Arg Leu Arg  
165 170 175

Glu Gln Val Glu Glu Leu Arg Lys Asn Leu Ala Pro Tyr Ser Ser Glu  
180 185 190

Leu Arg Gln Lys Leu Ser Gln Lys Leu Glu Glu Ile Arg Glu Arg Gly  
195 200 205

Ile Pro Gln Ala Ser Glu Tyr Gln Ala Lys Val Val Glu Gln Leu Ser  
210 215 220

Asn Leu Arg Glu Lys Met Thr Pro Leu Val Gln Glu Phe Lys Glu Arg  
225 230 235 240

Leu Thr Pro Tyr Ala Glu Asn Leu Lys Asn Arg Leu Ile Asp Leu Leu  
245 250 255

Asp Glu Val Gln Lys Thr Met Ala  
260

<210> 22  
5 <211> 264  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 22

10

Met Arg Val Val Val Val Thr Leu Ala Leu Leu Phe Leu Thr Gly Thr  
1 5 10 15

ES 2 558 751 T3

Gln Ala Arg Tyr Phe Trp Gln His Asp Glu Pro Gln Ala Pro Leu Asp  
 20 25 30

Arg Leu Arg Asp Leu Val Asp Val Tyr Leu Glu Thr Val Lys Ala Ser  
 35 40 45

Gly Lys Asp Ala Ile Ala Gln Phe Glu Ala Ser Ala Val Gly Lys Gln  
 50 55 60

Leu Asp Leu Lys Leu Ala Asp Asn Leu Asp Thr Leu Gly Ala Ala Ala  
 65 70 75 80

Ala Lys Leu Arg Glu Asp Met Ala Pro Tyr Tyr Lys Glu Val Arg Glu  
 85 90 95

Met Trp Leu Lys Asp Thr Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Thr Lys Asp  
 100 105 110

Leu Glu Glu Val Lys Glu Lys Ile Arg Pro Phe Leu Asp Gln Phe Ser  
 115 120 125

Ala Lys Trp Thr Glu Glu Leu Glu Gln Tyr Arg Gln Arg Leu Ala Pro  
 130 135 140

Val Ala Glu Glu Leu Lys Glu Leu Thr Lys Gln Lys Val Glu Leu Met  
 145 150 155 160

Gln Gln Lys Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Ala Arg Asp Arg Leu Arg  
 165 170 175

Gly His Val Glu Glu Leu Arg Lys Asn Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu  
 180 185 190

Leu Arg Gln Lys Leu Ser Gln Lys Leu Glu Glu Ile Arg Glu Lys Gly  
 195 200 205

Ile Pro Gln Ala Ala Glu Tyr Gln Ala Lys Val Val Glu Gln Leu Ser  
 210 215 220

Asn Leu Arg Glu Lys Met Thr Pro Leu Val Gln Asp Phe Lys Glu Arg  
 225 230 235 240

Leu Thr Pro Tyr Ala Glu Asn Leu Lys Thr Arg Phe Ile Ser Leu Leu  
 245 250 255

Asp Glu Leu Gln Lys Thr Val Ala  
 260

ES 2 558 751 T3

<211> 262  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 23

Met Lys Phe Leu Ala Leu Ala Leu Thr Ile Leu Leu Ala Ala Gly Thr  
 1 5 10 15

Gln Ala Phe Pro Met Gln Ala Asp Ala Pro Ser Gln Leu Glu His Val  
 20 25 30

Lys Ala Ala Leu Ser Met Tyr Ile Ala Gln Val Lys Leu Thr Ala Gln  
 35 40 45

Arg Ser Ile Asp Leu Leu Asp Asp Thr Glu Tyr Lys Glu Tyr Lys Met  
 50 55 60

Gln Leu Thr Gln Ser Leu Asp Asn Leu Gln Gln Tyr Ala Asp Ala Thr  
 65 70 75 80

Ser Gln Ser Leu Ala Pro Tyr Ser Glu Ala Phe Gly Thr Gln Leu Thr  
 85 90 95

Asp Ala Thr Ala Ala Val Arg Ala Glu Val Met Lys Asp Val Glu Glu  
 100 105 110

Leu Arg Ser Gln Leu Glu Pro Lys Arg Ala Glu Leu Lys Glu Val Leu  
 115 120 125

Asp Lys His Ile Asp Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Glu Pro Leu Ile Lys  
 130 135 140

Glu His Ile Glu Leu Arg Arg Thr Glu Met Glu Ala Phe Arg Ala Lys  
 145 150 155 160

Met Glu Pro Ile Val Glu Glu Leu Arg Ala Lys Val Ala Ile Asn Val  
 165 170 175

Glu Glu Thr Lys Thr Lys Leu Met Pro Ile Val Glu Ile Val Arg Ala  
 180 185 190

Lys Leu Thr Glu Arg Leu Glu Glu Leu Arg Thr Leu Ala Ala Pro Tyr  
 195 200 205

Ala Glu Glu Tyr Lys Glu Gln Met Ile Lys Ala Val Gly Glu Val Arg  
 210 215 220

Glu Lys Val Ser Pro Leu Ser Glu Asp Phe Lys Gly Gln Val Gly Pro

ES 2 558 751 T3

225 230 235 240

Ala Ala Glu Gln Ala Lys Gln Lys Leu Leu Ala Phe Tyr Glu Thr Ile  
245 250 255

Ser Gln Ala Met Lys Ala  
260

<210> 24  
<211> 262  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Lys Phe Leu Ala Leu Ala Leu Thr Ile Leu Leu Ala Ala Ala Thr  
1 5 10 15

Gln Ala Val Pro Met Gln Ala Asp Ala Pro Ser Gln Leu Glu His Val  
20 25 30

Lys Val Ala Met Met Glu Tyr Met Ala Gln Val Lys Glu Thr Gly Gln  
35 40 45

Arg Ser Ile Asp Leu Leu Asp Asp Thr Glu Phe Lys Glu Tyr Lys Val  
50 55 60

Gln Leu Ser Gln Ser Leu Asp Asn Leu Gln Gln Tyr Ala Gln Thr Thr  
65 70 75 80

Ser Gln Ser Leu Ala Pro Tyr Ser Glu Ala Phe Gly Ala Gln Leu Thr  
85 90 95

Asp Ala Ala Ala Val Arg Ala Glu Val Met Lys Asp Val Glu Asp  
100 105 110

Val Arg Thr Gln Leu Glu Pro Lys Arg Ala Glu Leu Lys Glu Val Leu  
115 120 125

Asp Lys His Ile Asp Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Glu Pro Leu Ile Lys  
130 135 140

Glu Ile Val Glu Gln Arg Arg Thr Glu Leu Glu Ala Phe Arg Val Lys  
145 150 155 160

Met Glu Pro Val Val Glu Glu Met Arg Ala Lys Val Ser Thr Asn Val  
165 170 175

Glu Glu Thr Lys Ala Lys Leu Met Pro Ile Val Glu Thr Val Arg Ala  
180 185 190

10

ES 2 558 751 T3

Lys Leu Thr Glu Arg Leu Glu Glu Leu Arg Thr Leu Ala Ala Pro Tyr  
 195 200 205

Ala Glu Glu Tyr Lys Glu Gln Met Phe Lys Ala Val Gly Glu Val Arg  
 210 215 220

Glu Lys Val Gly Pro Leu Thr Asn Asp Phe Lys Gly Gln Val Gly Pro  
 225 230 235 240

Ala Ala Glu Gln Ala Lys Glu Lys Leu Met Asp Phe Tyr Glu Thr Ile  
 245 250 255

Ser Gln Ala Met Lys Ala  
 260

5 <210> 25  
 <211> 258  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 25

Met Lys Phe Leu Val Leu Ala Leu Thr Ile Leu Leu Ala Ala Gly Thr  
 1 5 10 15

Gln Ala Phe Pro Met Gln Ala Asp Ala Pro Ser Gln Leu Glu His Val  
 20 25 30

Lys Ala Ala Leu Asn Met Tyr Ile Ala Gln Val Lys Leu Thr Ala Gln  
 35 40 45

Arg Ser Ile Asp Leu Leu Asp Asp Thr Glu Tyr Lys Glu Tyr Lys Met  
 50 55 60

Gln Leu Ser Gln Ser Leu Asp Asn Leu Gln Gln Phe Ala Asp Ser Thr  
 65 70 75 80

Ser Lys Ser Trp Pro Pro Thr Pro Arg Ser Ser Ala Pro Ser Cys Asp  
 85 90 95

Ala Thr Ala Thr Val Arg Ala Glu Val Met Lys Asp Val Glu Asp Val  
 100 105 110

Arg Thr Gln Leu Glu Pro Lys Arg Ala Glu Leu Thr Glu Val Leu Asn  
 115 120 125

Lys His Ile Asp Glu Tyr Arg Lys Lys Leu Glu Pro Leu Ile Lys Gln  
 130 135 140

His Ile Glu Leu Arg Arg Thr Glu Met Asp Ala Phe Arg Ala Lys Ile



ES 2 558 751 T3

Leu Arg Ser Lys Leu Glu Pro His Arg Ala Glu Leu Tyr Thr Ala Leu  
 115 120 125

Gln Lys His Ile Asp Glu Tyr Arg Glu Lys Leu Glu Pro Val Phe Gln  
 130 135 140

Glu Tyr Ser Ala Leu Asn Arg Gln Asn Ala Glu Gln Leu Arg Ala Lys  
 145 150 155 160

Leu Glu Pro Leu Met Asp Asp Ile Arg Lys Ala Phe Glu Ser Asn Ile  
 165 170 175

Glu Glu Thr Lys Ser Lys Val Val Pro Met Val Glu Ala Val Arg Thr  
 180 185 190

Lys Leu Thr Glu Arg Leu Glu Asp Leu Arg Thr Met Ala Ala Pro Tyr  
 195 200 205

Ala Glu Glu Tyr Lys Glu Gln Leu Val Lys Ala Val Glu Glu Ala Arg  
 210 215 220

Glu Lys Ile Ala Pro His Thr Gln Asp Leu Gln Thr Arg Met Glu Pro  
 225 230 235 240

Tyr Met Glu Asn Val Arg Thr Thr Phe Ala Gln Met Tyr Glu Thr Ile  
 245 250 255

Ala Lys Ala Ile Gln Ala  
 260

<210> 27  
 <211> 260  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Met Lys Phe Ala Ala Leu Ala Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Gly Ser  
 1 5 10 15

His Ala Ala Ser Met Gln Ala Asp Ala Pro Ser Gln Leu Asp His Ala  
 20 25 30

Arg Ala Val Leu Asp Val Tyr Leu Thr Gln Val Lys Asp Met Ser Leu  
 35 40 45

Arg Ala Val Asn Gln Leu Asp Asp Pro Gln Tyr Ala Glu Phe Lys Thr  
 50 55 60

10 Asn Leu Ala Gln Arg Ile Glu Glu Met Tyr Thr Gln Ile Lys Thr Leu





ES 2 558 751 T3

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

ES 2 558 751 T3

Leu Ala Glu Leu Gly Gly His Leu Asp Gln Gln Val Glu Glu Phe Arg  
 290 295 300

Arg Arg Val Glu Pro Tyr Gly Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln  
 305 310 315 320

Gln Met Glu Gln Leu Arg Gln Lys Leu Gly Pro His Ala Gly Asp Val  
 325 330 335

Glu Gly His Leu Ser Phe Leu Glu Lys Asp Leu Arg Asp Lys Val Asn  
 340 345 350

Ser Phe Phe Ser Thr Phe Lys Glu Lys Glu Ser Gln Asp Lys Thr Leu  
 355 360 365

Ser Leu Pro Glu Leu Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln Glu Gln Gln  
 370 375 380

Gln Glu Gln Val Gln Met Leu Ala Pro Leu Glu Ser  
 385 390 395

<210> 29  
 <211> 429  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Met Phe Leu Lys Ala Val Val Leu Thr Leu Ala Leu Val Ala Val Thr  
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Ala Glu Val Ser Ala Asp Gln Val Ala Thr Val Met Trp  
 20 25 30

Asp Tyr Phe Ser Gln Leu Ser Ser Asn Ala Lys Glu Ala Val Glu His  
 35 40 45

Leu Gln Lys Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Asn Ala Leu Phe Gln Asp  
 50 55 60

Lys Leu Gly Glu Val Asn Thr Tyr Ala Gly Asp Leu Gln Lys Lys Leu  
 65 70 75 80

Val Pro Phe Ala Thr Glu Leu His Glu Arg Leu Ala Lys Asp Ser Glu  
 85 90 95

Lys Leu Lys Glu Glu Ile Arg Lys Glu Leu Glu Glu Val Arg Ala Arg  
 100 105 110

Leu Leu Pro His Ala Asn Glu Val Ser Gln Lys Ile Gly Glu Asn Val  
 115 120 125

10

ES 2 558 751 T3

Arg Glu Leu Gln Gln Arg Leu Glu Pro Tyr Thr Asp Gln Leu Arg Thr  
 130 135 140

Gln Val Asn Thr Gln Thr Glu Gln Leu Arg Arg Gln Leu Thr Pro Tyr  
 145 150 155 160

Ala Gln Arg Met Glu Arg Val Leu Arg Glu Asn Ala Asp Ser Leu Gln  
 165 170 175

Thr Ser Leu Arg Pro His Ala Asp Gln Leu Lys Ala Lys Ile Asp Gln  
 180 185 190

Asn Val Glu Glu Leu Lys Glu Arg Leu Thr Pro Tyr Ala Asp Glu Phe  
 195 200 205

Lys Val Lys Ile Asp Gln Thr Val Glu Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala  
 210 215 220

Pro Tyr Ala Gln Asp Ala Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Leu Glu Gly  
 225 230 235 240

Leu Ala Phe Gln Met Lys Lys Asn Ala Glu Glu Leu Lys Ala Arg Ile  
 245 250 255

Ser Ala Ser Ala Glu Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Pro Leu Ala Glu  
 260 265 270

Asp Met Arg Gly Asn Leu Arg Gly Asn Thr Glu Gly Leu Gln Lys Ser  
 275 280 285

Leu Ala Glu Leu Gly Gly His Leu Asp Arg His Val Glu Glu Phe Arg  
 290 295 300

Leu Arg Val Glu Pro Tyr Gly Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln  
 305 310 315 320

Gln Met Glu Gln Leu Arg Gln Lys Leu Gly Pro His Ala Gly Asp Val  
 325 330 335

Glu Gly His Leu Ser Phe Leu Glu Lys Asp Leu Arg Asp Lys Val Asn  
 340 345 350

Ser Phe Phe Ser Thr Phe Lys Glu Lys Glu Ser Gln Asp Asn Thr Leu  
 355 360 365

Ser Leu Pro Glu Pro Glu Gln Gln Arg Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln  
 370 375 380

ES 2 558 751 T3

Gln Glu Gln Glu Gln Glu Gln Gln Gln Gln Gln Glu Gln Gln Gln Gln  
 385 390 395 400

Gln Glu Gln Gln Arg Glu Gln Gln Gln Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln  
 405 410 415

Gln Gln Glu Gln Val Gln Met Leu Ala Pro Leu Glu Ser  
 420 425

<210> 30  
 <211> 395  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 30

Met Phe Leu Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Leu Val Ala Ile Thr  
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Ala Glu Val Thr Ser Asp Gln Val Ala Asn Val Val Trp  
 20 25 30

Asp Tyr Phe Thr Gln Leu Ser Asn Asn Ala Lys Glu Ala Val Glu Gln  
 35 40 45

Phe Gln Lys Thr Asp Val Thr Gln Gln Leu Ser Thr Leu Phe Gln Asp  
 50 55 60

Lys Leu Gly Asp Ala Ser Thr Tyr Ala Asp Gly Val His Asn Lys Leu  
 65 70 75 80

Val Pro Phe Val Val Gln Leu Ser Gly His Leu Ala Lys Glu Thr Glu  
 85 90 95

Arg Val Lys Glu Glu Ile Lys Lys Glu Leu Glu Asp Leu Arg Asp Arg  
 100 105 110

Met Met Pro His Ala Asn Lys Val Thr Gln Thr Phe Gly Glu Asn Met  
 115 120 125

Gln Lys Leu Gln Glu His Leu Lys Pro Tyr Ala Val Asp Leu Gln Asp  
 130 135 140

Gln Ile Asn Thr Gln Thr Gln Glu Met Lys Leu Gln Leu Thr Pro Tyr  
 145 150 155 160

Ile Gln Arg Met Gln Thr Thr Ile Lys Glu Asn Val Asp Asn Leu His  
 165 170 175

10

Thr Ser Met Met Pro Leu Ala Thr Asn Leu Lys Asp Lys Phe Asn Arg



ES 2 558 751 T3

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

ES 2 558 751 T3

Leu Ala Glu Leu Gly Gly His Leu Asp Arg His Val Glu Glu Phe Arg  
 275 280 285

Leu Arg Val Glu Pro Tyr Gly Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln  
 290 295 300

Gln Met Glu Gln Leu Arg Gln Lys Leu Gly Pro His Ala Gly Asp Val  
 305 310 315 320

Glu Gly His Leu Ser Phe Leu Glu Lys Asp Leu Arg Asp Lys Val Asn  
 325 330 335

Ser Phe Phe Ser Thr Phe Lys Glu Lys Glu Ser Gln Asp Asn Thr Leu  
 340 345 350

Ser Leu Pro Glu Pro Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln Glu  
 355 360 365

Gln Gln Gln Glu Gln Gln Glu Glu Gln Gln Gln Gln Glu Gln Gln Gln  
 370 375 380

Glu Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln Val Gln Met Leu Ala Pro Leu Glu  
 385 390 395 400

Ser

<210> 32  
 <211> 382  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 32

5

10

Met Phe Leu Lys Ala Val Val Leu Ser Leu Ala Leu Val Ala Val Thr  
 1 5 10 15

Gly Ala Arg Ala Glu Val Asn Ala Asp Gln Val Ala Thr Val Met Trp  
 20 25 30

Asp Tyr Phe Ser Gln Leu Gly Ser Asn Ala Lys Lys Ala Val Glu His  
 35 40 45

Leu Gln Lys Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Asn Thr Leu Phe Gln Asp  
 50 55 60

Lys Leu Gly Glu Val Asn Thr Tyr Thr Glu Asp Leu Gln Lys Lys Leu  
 65 70 75 80

Val Pro Phe Ala Thr Glu Leu His Glu Arg Leu Thr Lys Asp Ser Glu  
 85 90 95



ES 2 558 751 T3

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

ES 2 558 751 T3

Thr Phe Phe Ser Thr Leu Lys Glu Glu Ala Ser Gln Gly Gln Ser Gln  
 355 360 365

Ala Leu Pro Ala Gln Glu Lys Ala Gln Ala Pro Leu Glu Gly  
 370 375 380

5  
 <210> 33  
 <211> 391  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 33

Met Phe Leu Lys Ala Val Val Leu Thr Val Ala Leu Val Ala Ile Thr  
 1 5 10 15

Gly Thr Gln Ala Glu Val Thr Ser Asp Gln Val Ala Asn Val Met Trp  
 20 25 30

Asp Tyr Phe Thr Gln Leu Ser Asn Asn Ala Lys Glu Ala Val Glu Gln  
 35 40 45

Leu Gln Lys Thr Asp Val Thr Gln Gln Leu Asn Thr Leu Phe Gln Asp  
 50 55 60

Lys Leu Gly Asn Ile Asn Thr Tyr Ala Asp Asp Leu Gln Asn Lys Leu  
 65 70 75 80

Val Pro Phe Ala Val Gln Leu Ser Gly His Leu Thr Lys Glu Thr Glu  
 85 90 95

Arg Val Arg Glu Glu Ile Gln Lys Glu Leu Glu Asp Leu Arg Ala Asn  
 100 105 110

Met Met Pro His Ala Asn Lys Val Ser Gln Met Phe Gly Asp Asn Val  
 115 120 125

Gln Lys Leu Gln Glu His Leu Arg Pro Tyr Ala Thr Asp Leu Gln Ala  
 130 135 140

Gln Ile Asn Ala Gln Thr Gln Asp Met Lys Arg Gln Leu Thr Pro Tyr  
 145 150 155 160

Ile Gln Arg Met Gln Thr Thr Ile Gln Asp Asn Val Glu Asn Leu Gln  
 165 170 175

Ser Ser Met Val Pro Phe Ala Asn Glu Leu Lys Glu Lys Phe Asn Gln  
 180 185 190

10 Asn Met Glu Gly Leu Lys Gly Gln Leu Thr Pro Arg Ala Asn Glu Leu

ES 2 558 751 T3

	195		200		205														
	Lys	Ala	Thr	Ile	Asp	Gln	Asn	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Ser	Arg	Leu	Ala			
	210						215					220							
	Pro	Leu	Ala	Glu	Gly	Val	Gln	Glu	Lys	Leu	Asn	His	Gln	Met	Glu	Gly			
	225					230					235					240			
	Leu	Ala	Phe	Gln	Met	Lys	Lys	Asn	Ala	Glu	Glu	Leu	Gln	Thr	Lys	Val			
					245					250					255				
	Ser	Thr	Asn	Ile	Asp	Gln	Leu	Gln	Lys	Asn	Leu	Ala	Pro	Leu	Val	Glu			
				260					265					270					
	Asp	Val	Gln	Ser	Lys	Leu	Lys	Gly	Asn	Thr	Glu	Gly	Leu	Gln	Lys	Ser			
			275					280					285						
	Leu	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Gln	Leu	Asp	Gln	Gln	Val	Glu	Val	Phe	Arg			
		290					295					300							
	Arg	Ala	Val	Glu	Pro	Leu	Gly	Asp	Lys	Phe	Asn	Met	Ala	Leu	Val	Gln			
	305					310					315					320			
	Gln	Met	Glu	Lys	Phe	Arg	Gln	Gln	Leu	Gly	Ser	Asp	Ser	Gly	Asp	Val			
					325					330					335				
	Glu	Ser	His	Leu	Ser	Phe	Leu	Glu	Lys	Asn	Leu	Arg	Glu	Lys	Val	Ser			
				340					345					350					
	Ser	Phe	Met	Ser	Thr	Leu	Gln	Lys	Lys	Gly	Ser	Pro	Asp	Gln	Pro	Leu			
			355					360					365						
	Ala	Leu	Pro	Leu	Pro	Glu	Gln	Val	Gln	Glu	Gln	Val	Gln	Glu	Gln	Val			
		370					375					380							
	Gln	Pro	Lys	Pro	Leu	Glu	Ser												
	385					390													

- <210> 34
- 5 <211> 285
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Tetranectina-apolipoproteína A-I
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE

ES 2 558 751 T3

<223> X = A o G o S o T

<220>

<221> misc\_feature

5 <222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 34

```

Xaa Pro Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val Val Asn Thr Lys Met Phe
 1                               5                               10          15

Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu Ala Gln Glu Val Ala Leu
                20                               25          30

Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val Asp Glu Pro Pro Gln Ser
    35                               40          45

Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu
    50                               55          60

Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu
 65                               70          75          80

Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr
                85                               90          95

Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu
                100                              105          110

Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met
    115                              120          125

Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp
    130                              135          140

Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys
 145                              150          155          160

Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu
                165                              170          175

His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp
    180                              185          190

Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr
    195                              200          205

Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys
    210                              215          220

Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu
 225                              230          235          240

```

10

ES 2 558 751 T3

His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu  
 245 250 255

Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu  
 260 265 270

Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln  
 275 280 285

- <210> 35
- 5 <211> 291
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Tetranectina-apolipoproteína A-I con etiqueta de His N-terminal
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (7)..(7)
- 15 <223> X = cualquiera de entre AP, GP, SP, PP, GSAP, GSGP, GSSP, GSPP, GGGs, GGGGS, GGGSGGGs, GGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGs, GGGSGGGSGGGGS, GGGGSAP, GGGSGP, GGGSSP
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- 20 <222> (7)..(7)
- <223> X = cualquiera de entre GGGSP, GGGGSAP, GGGGSGP, GGGGSSP, GGGGSPP, GGGSGGGsAP, GGGSGGGSGP, GGGSGGGSSP, GGGSGGGSP, GGGSGGGSGGSAP, GGGSGGGSGGGSP, GGGSGGGSGGGSSP, GGGSGGGSGGGSP
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (7)..(7)
- <223> X = cualquiera de entre GGGGSAP, GGGGSGP, GGGGSSP, GGGGSPP, GGGSGGGGSAP, GGGSGGGGSAP, GGGSGGGSSP, GGGSGGGSP, GGGSGGGSGGSAP, GGGSGGGSGGGSP, GGGSGGGSGGGSSP, and GGGSGGGSGGGSSP.
- 30 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (8)..(8)
- 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- <400> 35

Met His His His His His His Xaa Ile Val Asn Ala Lys Lys Asp Val  
 1 5 10 15

Val Asn Thr Lys Met Phe Glu Glu Leu Lys Ser Arg Leu Asp Thr Leu  
 20 25 30

Ala Gln Glu Val Ala Leu Leu Lys Glu Gln Gln Ala Leu Gln Thr Val  
 35 40 45

Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr  
 50 55 60

ES 2 558 751 T3

Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln  
65 70 75 80

Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp  
85 90 95

Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu  
100 105 110

Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu  
115 120 125

Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys  
130 135 140

Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met  
145 150 155 160

Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu  
165 170 175

Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu  
180 185 190

Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg  
195 200 205

Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala  
210 215 220

Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr  
225 230 235 240

His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys  
245 250 255

Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser  
260 265 270

Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu  
275 280 285

Asn Thr Gln  
290

<210> 36

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 558 751 T3

<223> fragmento de una secuencia de interferón

<400> 36

5 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu  
1 5

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> etiqueta hexa-histidina

15 <400> 37

His His His His His His  
1 5

<210> 38

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> corte de IgA proteasa

<400> 38

Val Val Ala Pro Pro Ala Pro  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir un polipéptido comprende las etapas de:
- 5 a) cultivar una célula de *Escherichia coli* que comprende un ácido nucleico codificante del polipéptido,  
b) ajustar el valor del pH durante el cultivo, con una solución alcalina que comprende un aminoácido seleccionado de entre aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano y tirosina,  
10 c) recuperar el polipéptido a partir de la célula o del medio de cultivo, produciendo de esta manera el polipéptido, en el que el aminoácido presenta una concentración en la solución alcalina de 30 g/l o superior, y en el que la solución alcalina es una solución de amonio de 10% (p/v) o superior.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la célula bacteriana es una célula auxotrópica para un aminoácido y la auxotrofia es para un aminoácido seleccionado de entre aspartato, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptófano y tirosina.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la solución alcalina presenta un valor de pH de 9 o superior.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el polipéptido es la apolipoproteína A1 humana o un derivado de la misma.
5. Método según la reivindicación 4, caracterizado por que la apolipoproteína A1 presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 01 y nº 35.
- 25 6. Método según la reivindicación 5, caracterizado por que la apolipoproteína A1 presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEC ID nº 01, nº 02, nº 34 y nº 35.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el aminoácido presenta una concentración de aproximadamente 50 g/l.
- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la solución alcalina es una solución de amonio de aproximadamente 12,5% (p/v) de amonio en agua.
- 35 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el aminoácido es la leucina.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la solución alcalina comprende leucina y prolina.
- 40 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la solución alcalina es una solución de amonio de aproximadamente 12,5% (p/v) y comprende los aminoácidos leucina y prolina, cada uno a una concentración de aproximadamente 50 g/l.



Fig. 1

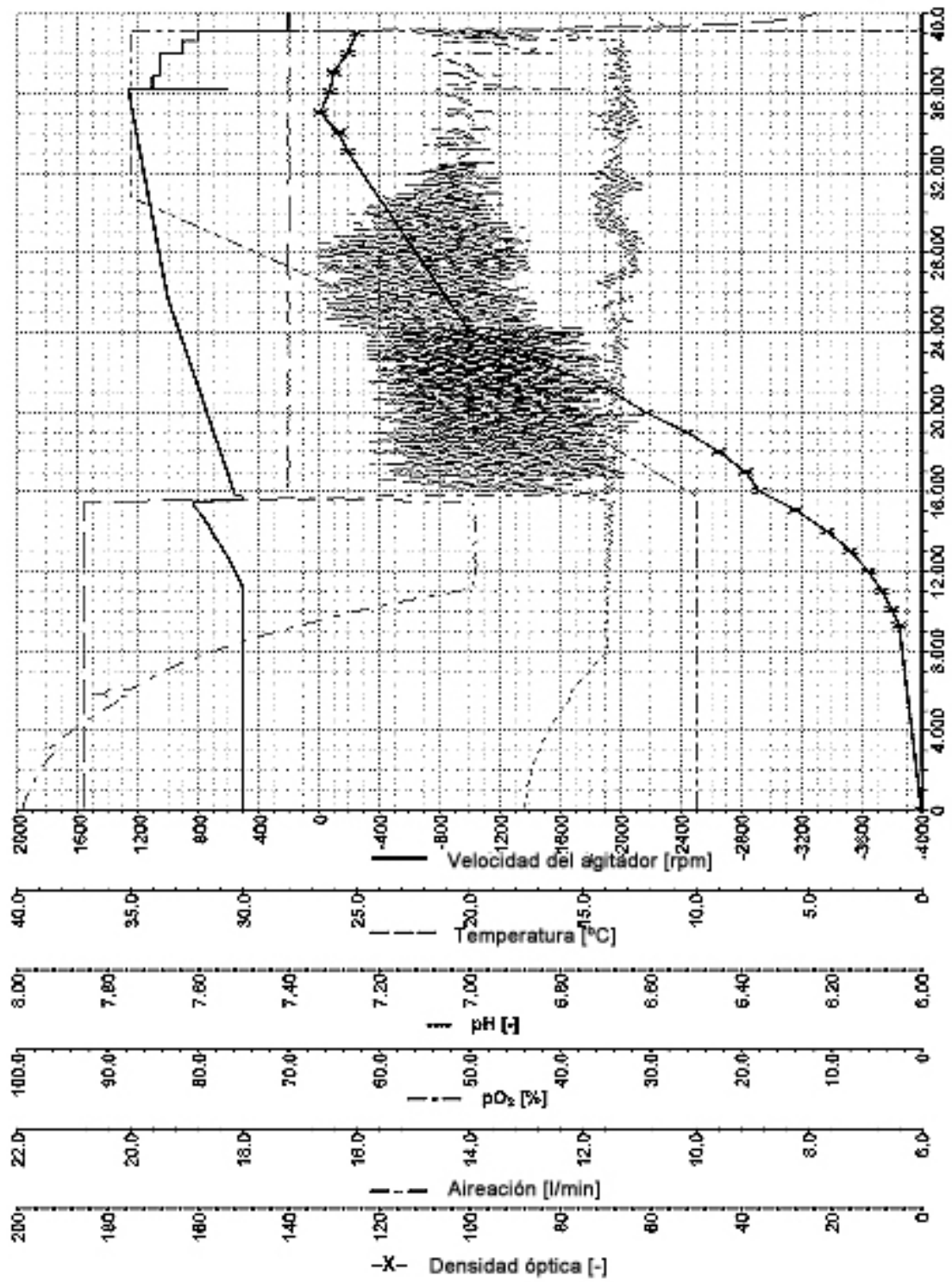
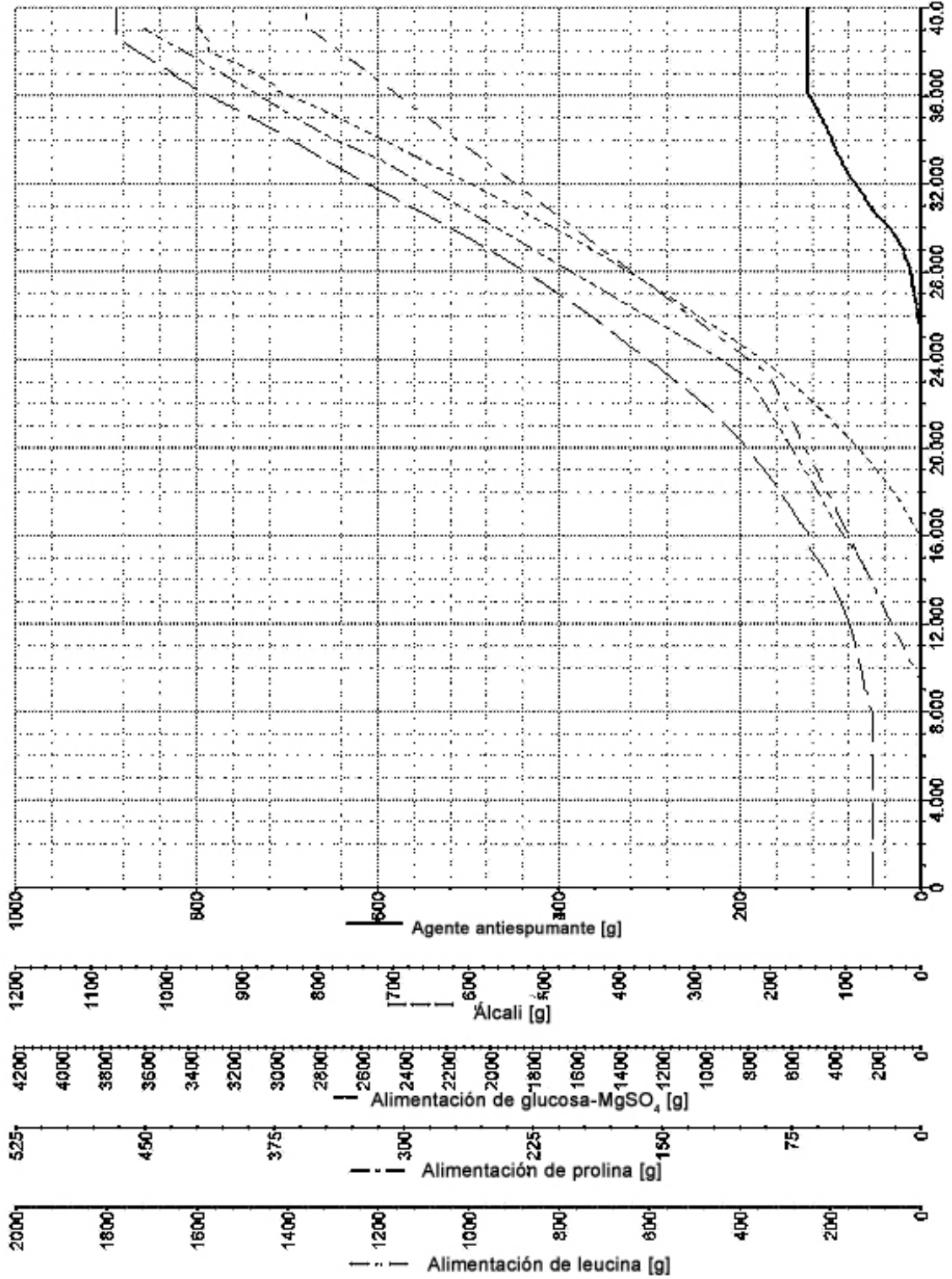


Fig. 2



**Fig. 3**

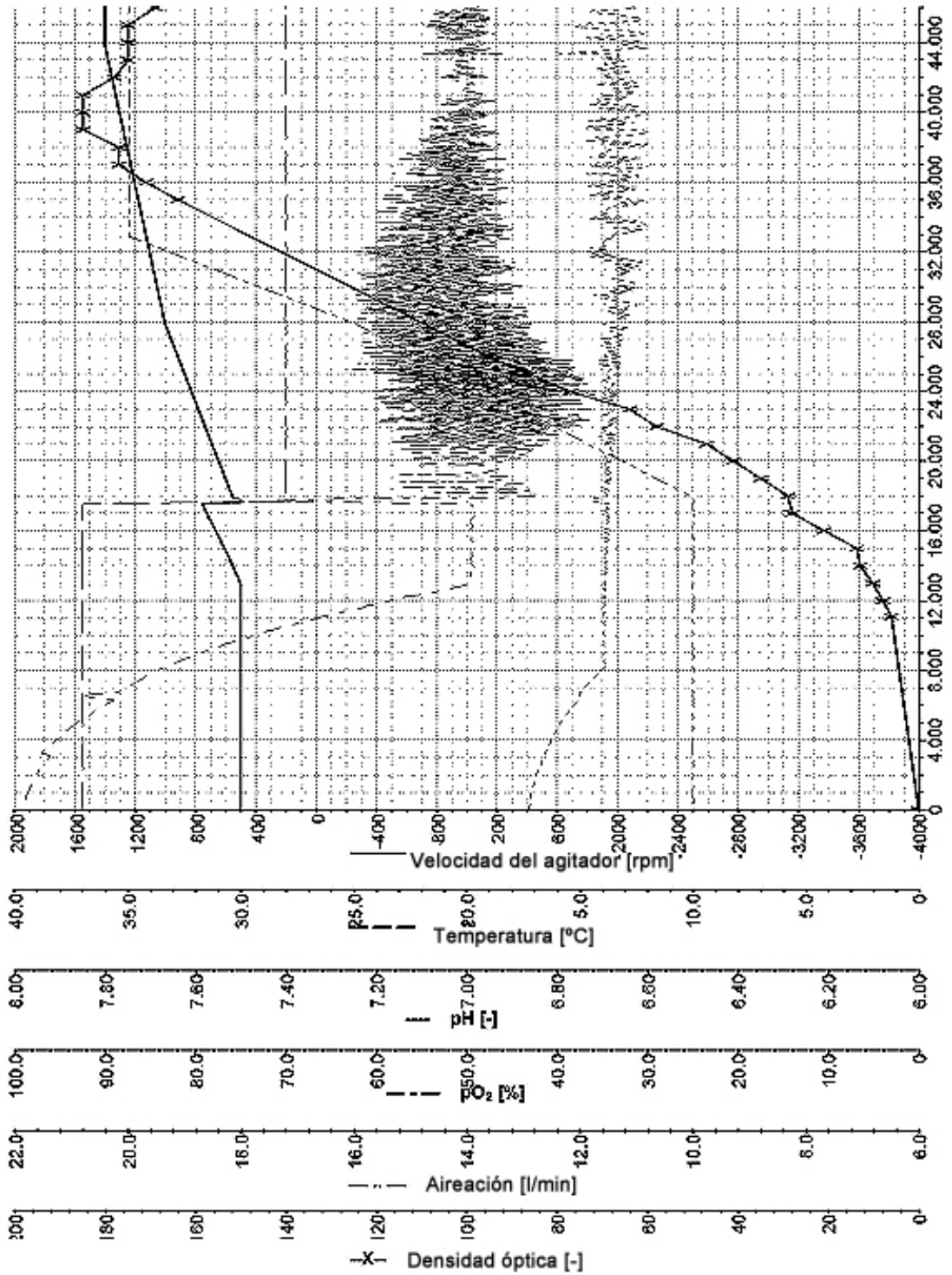


Fig. 4

