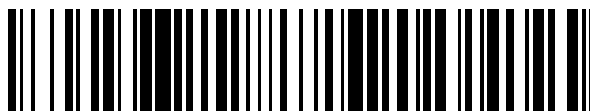


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 052**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

C07K 14/075 (2006.01)

A61K 47/61 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2013 PCT/US2013/053493**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14022811**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2013 E 13826083 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2880160**

54 Título: **Aislamiento de mutantes potenciadores del tráfico de proteína de entrega de fármacos**

30 Prioridad:

03.08.2012 US 201261679306 P

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

06.03.2019

73 Titular/es:

**CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER (100.0%)
8700 Beverly Boulevard
Los Angeles, CA 90048 , US**

72 Inventor/es:

MEDINA-KAUWE, LALI K.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 703 052 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

Aislamiento de mutantes potenciadores del tráfico de proteína de entrega de fármacos

5 Campo de la invención

La invención proporciona composiciones para la función de penetración celular para mejorar la entrega de fármacos a orgánulos específicos y métodos de generación de dichas composiciones.

10 Antecedentes de la invención

La evolución dirigida se ha utilizado para generar cápsides de virus adenoasociados pseudotipados (VAA, por sus siglas en inglés) con nuevo tropismo, entrega inespecífica reducida y evasión inmunitaria (Kwon y Schaffer, 2008; Maheshri et al., 2006). La bioselección de la presentación de fagos y las bibliotecas víricas completas *in vitro* e *in vivo* con diferentes presiones selectivas ha generado proteínas con propiedades deseadas tales como la mejora de la unión y la captación de ligandos, las interacciones inmunitarias o las actividades enzimáticas (Yuan et al., 2005). Por tanto, esta metodología puede ser una alternativa potente y más eficaz a la mutación racional para crear nuevas variantes de proteínas con características mejoradas. El enfoque más recientemente desarrollado para este proceso emplea PCR propensa a errores y extensión escalonada para crear una biblioteca de variantes que puede cribarse contra diferentes tipos celulares para seleccionar vectores específicos para células específicas (Zhao et al., 1998). El documento US 2012/004181 A1 desvela un sistema de entrega dirigida para ARNip o tecnología antisentido y un método de tratamiento del cáncer mediante la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de HerPBK10 combinado con ARNip, dando como resultado la inhibición de la expresión de Her2 y la muerte celular. El documento WO 98/35036 A1 desvela variantes de heregulina que son capaces de unirse a un receptor ErbB, incluyendo variantes de heregulinas humanas y, en particular, variantes de heregulina-beta 1 que tienen una afinidad potenciada por los receptores ErbB-3 y ErbB-4, en el que las variantes incluyen al menos una sustitución de aminoácido y pueden incluir modificaciones adicionales. El documento WO 2009/009441 A2 desvela un complejo que puede inyectarse en el cuerpo para concentrarse en las células diana para entregar moléculas, un sistema de entrega de fármacos que incluye componentes que se autoensamblan en un conjugado dirigido y una proteína transportadora dirigida y una secuencia de ácido nucleico unida no covalentemente a uno o más fármacos. Hasta la fecha, aún no se ha desarrollado ningún proceso para aislar variantes de proteínas con funciones mejoradas de tráfico intracelular. La presente invención introduce un nuevo procedimiento y nuevas moléculas de proteínas con funciones de penetración celular mejoradas para la entrega de fármacos como resultado del procedimiento.

35 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido para entregar un agente terapéutico a un orgánulo de una célula, que comprende un polipéptido de base de pentona (PB, por sus siglas en inglés) de adenovirus, en el que:

40 el polipéptido de base de pentona comprende el polipéptido de base de pentona indicado en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 20; o

el polipéptido de base de pentona consiste en el polipéptido de base de pentona indicado en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18; o

45 el polipéptido de base de pentona es un polipéptido de base de pentona de adenovirus humano de tipo 5 que comprende una mutación Leu60Trp; o

50 el polipéptido de base de pentona es un polipéptido de base de pentona de adenovirus humano de tipo 5 que comprende una mutación Lys375Glu, una mutación Val449Met y una mutación Pro469Ser. En el presente documento también se desvela un método de potenciación del tráfico a una célula, que comprende proporcionar una composición que comprende una proteína de base de pentona (PB) con una o más mutaciones que potencian la entrada celular y administrar una dosis eficaz de la composición a la célula. En una realización, la una o más mutaciones es 111C y/o 333F. En otra realización, el polipéptido de la presente invención se dirige al citoplasma y/o núcleo de la célula. En otra realización, la presente invención se refiere a un agente terapéutico que comprende el polipéptido de la presente invención, en la que la composición comprende adicionalmente un fármaco terapéutico. En otra realización, la célula es una célula tumoral. En otra realización, la una o más mutaciones es la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19 y/o SEQ ID NO: 20.

65 Otras realizaciones incluyen un método para producir una molécula de entrega de fármaco que se dirige a un orgánulo. El método incluye los siguientes etapas: a) obtener un polinucleótido que codifique un gen de la base de pentona (PB) de adenovirus humano y generar mutantes del polinucleótido, b) clonar los polinucleótidos mutantes en vectores de fagos y generar una biblioteca de fagos que comprenda los vectores de fagos, c) transformar células

con la biblioteca de fagos, d) fraccionar las células transformadas y recoger el orgánulo de las células transformadas, e) amplificar los fagos del orgánulo recogido, f) transformar células con los fagos amplificados del orgánulo recogido, g) repetir las etapas (d), (e) y (f), h) titular los fagos del orgánulo recogido, i) seleccionar los fagos con el título más alto y obtener las secuencias del polinucleótido mutante de los fagos y j) producir un polipéptido mutante codificado por una de las secuencias polinucleotídicas mutantes. En otra realización, el orgánulo se selecciona entre el grupo que consiste en mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, núcleo, ribosomas, membrana plasmática y citosol. En otra realización, las células son células de mamífero o no son de mamífero. En otra realización, los mutantes se generan usando uno o más de entre métodos basados en PCR, mutagénesis química, mutagénesis inducida por ultravioleta o una combinación de los mismos. En otra realización, la molécula de entrega de fármaco comprende un dominio de direccionamiento, un dominio de ligando endosomolítico y un dominio cargado positivamente.

Otras realizaciones incluyen un polipéptido para entregar un agente terapéutico a un orgánulo, que comprende un polipéptido codificado por una o más mutaciones de la base de pentona (PB) que potencian la entrada celular como se define en las reivindicaciones. En otra realización, la una o más mutaciones de la base de pentona (PB) incluyen 111C y/o 333F. En otra realización, el polipéptido comprende adicionalmente un motivo de polilisina. En otra realización, el polipéptido comprende adicionalmente un dominio de direccionamiento de heregulina. En otra realización, la una o más mutaciones de PB comprenden una supresión C terminal.

Otras realizaciones incluyen un agente terapéutico que comprende el polipéptido como se define en las reivindicaciones y un fármaco terapéutico. En otra realización, el fármaco terapéutico es un agente quimioterápico.

En el contexto de la presente invención también se desvela un método de producción de un transportador sin actividad proliferativa, que comprende a) obtener un polinucleótido que codifique el dominio de unión al receptor de heregulina (Her) y generar mutantes en el polinucleótido, b) clonar los polinucleótidos de Her mutantes en vectores de fagos y generando una biblioteca de fagos que comprenda los vectores de fagos, c) transformar células MDA-MB-435 con la biblioteca de fagos en presencia de inhibidores mitóticos, d) fraccionar la célula transformada y extraer la fracción de membrana de las células MDA-MB-435, e) recoger fagos de membrana de la fracción de membrana, f) transformar los fagos de membrana en células MDA-MB-435 en presencia de inhibidores mitóticos, g) repetir las etapas (d), (e) y (f), h) controlar la proliferación de células MDA-MB-435 en cada ronda y seleccionar los fagos de membrana con la proliferación más baja de células MDA-MB-435, i) obtener las secuencias de los mutantes polinucleotídicos de Her en los fagos de membrana seleccionados y j) producir polipéptidos codificados por las secuencias de Her y el gen de la base de pentona, donde los polipéptidos son el transportador sin actividad proliferativa.

Otras realizaciones incluyen un polipéptido como se define en las reivindicaciones para entregar productos terapéuticos al núcleo, que comprende un polipéptido codificado por secuencias de Her mutantes. En otra realización, el polipéptido comprende adicionalmente un polipéptido que codifica proteína de base de pentona (PB) como se define en las reivindicaciones y un motivo de polilisina. En otra realización, la proteína de PB es una proteína de base de pentona mutante como se define en las reivindicaciones.

Otras realizaciones incluyen un agente terapéutico que comprende un polipéptido como se define en las reivindicaciones y un fármaco terapéutico.

Breve descripción de las figuras

Las Figura 1 representan, de acuerdo con una realización en el presente documento, la estrategia de bioselección.

La Figura 2 representa, de acuerdo con una realización en el presente documento, una mutagénesis aleatoria basada en PCR del gen de la base de pentona. El producto de PCR (justo por encima de la banda de 1600 pb) contiene 100 ng de ADN, basado en el análisis de densitometría, lo que proporciona un rendimiento total de ~4800 ng. Como la diana inicial de ADN era de 97 ng, se obtiene una relación de rendimiento/inicial de ~50 y un número de duplicación de ~5,6, que cuando se extrapola contra la curva patrón proporcionada en el protocolo del fabricante (Genemorph II, Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.), corresponde a una tasa de mutación de ~8/kb.

La Figura 3 representa, de acuerdo con una realización en el presente documento, el aislamiento de fagos que presentan variantes de base de pentona con una partición potenciada en el compartimento nuclear. Una biblioteca de fago T7 que presenta PB mutagenizada aleatoriamente se añadió a 1×10^6 células HeLa a 1×10^8 ufp siguiendo las condiciones que se describen en el texto para la unión celular y la absorción. Las células se recogieron mediante tripsinización para retirar cualquier fago unido a la superficie, después se fraccionaron usando un kit de fraccionamiento comercial (Qproteome Cell Compartment Kit; Qiagen Inc., Valencia, CA, EE.UU.). El fago se precipitó con PEG durante la noche a partir de cada fracción siguiendo procedimientos convencionales, después se resuspendió en medios bacterianos TB y se añadió a bacterias BLT5403 para amplificar el fago aislado. El fago amplificado se tituló mediante un ensayo de placa y después se volvió a seleccionar en HeLa usando el mismo título y las condiciones descritas anteriormente. El fago obtenido a partir de fracciones citosólicas se sometió a 3 rondas de bioselección citosólica, mientras que el obtenido a partir de fracciones nucleares se sometió a 2 rondas.

La Figura 4 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, la alineación de variantes de tráfico aisladas a partir de bioselección.

La Figura 5 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, el mutante de longitud completa, 111C, que presenta un tráfico potenciado hacia el citoplasma y el núcleo. La Figura 5 (A) representa que la proteína se precipitó a partir de cada fracción mediante precipitación con acetona y los sedimentos se resuspendieron en 40 μ l de tampón de desalado, seguido de un análisis mediante SDS-PAGE y transferencia Western. La Figura 5 (B) representa el análisis de densidades de banda usando la Imagen J que muestra un aumento de 111C en las fracciones tanto citosólica como nuclear en comparación con la proteína de tipo silvestre. Ensayo de tráfico y fraccionamiento celular: se separaron células HeLa adherentes que crecían en matraces con 5 ml de 1XPBS + EDTA 2 mM a incubación a 37 °C con agitación durante 50 minutos y se transfirieron a tubos cónicos de 15 ml. Se midió la densidad de las células y las células se distribuyeron en tubos separados a 5×10^6 células por tubo. Las células se lavaron con 1X PBS + Ca^{2+} + Mg^{2+} tres veces para retirar el EDTA y los sedimentos celulares se resuspendieron en 0,7 ml de Tampón A (HEPES 20 mM, pH 7,4; MgCl_2 2 mM; BSA al 3 % en DMEM). Se añadió proteína de base de pentona de tipo silvestre (TS, por sus siglas en inglés) o mutante (111C, 333F) (450 μ g) a alícuotas de células separadas y las mezclas se incubaron a 4 °C durante 2 horas con agitación para promover la unión al receptor, seguido de incubación a 37 °C durante 2 h con agitación para promover la internalización de la proteína unida al receptor. Los tratamientos de control no recibieron ninguna proteína (NP, por sus siglas en inglés). Después, las células se recogieron y procesaron para el fraccionamiento subcelular usando el kit de ensayo Qproteome Cell Compartment (Qiagen).

La Figura 6 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, mutantes de PB, 111C y 333F, presentan una entrada nuclear mejorada en comparación con la PB de tipo silvestre. La Figura 6 (A) representa el tráfico intracelular y la inmunocitoquímica. El procedimiento siguió los protocolos establecidos detallados en *Gene Therapy* (2006) 13, 821-836. Se usó anticuerpo anti-base de pentona (anticuerpo Ad5) a una dilución de 1:500. Se usó el anticuerpo anti-conejo de cabra Alexa-Fluor 488 a una dilución de 1:400 (2º anticuerpo). Se usó faloidina a una dilución de 1:100 y se usó DAPI a 300 nM. Color verde: PB de tipo silvestre (TS, por sus siglas en inglés) o mutante (111C, 333F); color rojo: actina; color azul: núcleo. La Figura 6 (B) representa la cuantificación del tráfico de proteínas. Se seleccionaron para la cuantificación dieciséis células de cada tratamiento representado en el panel izquierdo. Los recuentos se basaron en el histograma de cada imagen en Adobe Photoshop. Las barras representan los recuentos de píxeles de color verdes dentro de la ventana 80-255 en el canal de color verde.

La Figura 7 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, una Alineación actualizada de Mutantes de PB. Las nuevas longitudes de péptidos se basan en secuencias de aminoácidos traducidas a partir de secuencias de ácido nucleico de clones mutantes. Se proporcionan secuencias en las Figuras 8-17 del presente documento.

La Figura 8 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, la secuencia de ácido nucleico y peptídica de la PB mutada de la Fracción 111 Clon A (111A).

La Figura 9 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, la secuencia de ácido nucleico y de aminoácidos prevista de la PB mutada de la Fracción 111 Clon C (111C).

La Figura 10 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, la secuencia de ácido nucleico y peptídica de la PB mutada de la Fracción 111 Clon G (111G).

La Figura 11 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, la secuencia de ácido nucleico y peptídica de la PB mutada de la Fracción 331 Clon E (331E).

La Figura 12 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, la secuencia de ácido nucleico y peptídica de la PB mutada de la Fracción 331 Clon I (331I).

La Figura 13 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, la secuencia de ácido nucleico y peptídica de la PB mutada de la Fracción 331 Clon J (331J).

La Figura 14 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, la secuencia de ácido nucleico y peptídica de la PB mutada de la Fracción 333 Clon A (333A).

La Figura 15 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, la secuencia de ácido nucleico y peptídica de la PB mutada de la Fracción 333 Clon D (333D).

La Figura 16 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, la secuencia de ácido nucleico y peptídica de la PB mutada de la Fracción 333 Clon E (333E).

La Figura 17 representa, de acuerdo con una realización del presente documento, la secuencia de ácido nucleico y peptídica de la PB mutada de la Fracción 333, clones F, G y H (333F, 333G, 333H).

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "PB" significa base de pentona.

- 5 Se ha desarrollado una diversidad de reactivos para entregar genes terapéuticos y fármacos a células enfermas, e incluyen liposomas, polímeros sintéticos, péptidos, proteínas, virus y nanopartículas víricas (Medina-Kauwe, 2006; Medina-Kauwe et al., 2005). Normalmente, las partículas formadas mediante estos reactivos requieren modificaciones para facilitar la entrega de carga útil de gen o fármaco. Dichas modificaciones incluyen adjuntar ligandos o anticuerpos de direccionamiento, agentes de penetración de membrana y/o agentes de direccionamiento intracelular (tal como direccionamiento nuclear). Estas modificaciones por lo general se introducen a través de un diseño racional y, por tanto, cada nueva variante generada mediante dicha modificación requiere ensayos empíricos. Esto puede requerir mucho tiempo y trabajo y conlleva el riesgo de producir una actividad subóptima.

- 15 Los intentos pasados y presentes para mejorar la penetración de la membrana celular y/o el tráfico intracelular han utilizado el diseño racional para conjugar la penetración celular o los péptidos de direccionamiento intracelular con transportadores de fármacos. Un enfoque de este tipo requiere ensayos empíricos de cada molécula. Se han sometido a ensayo numerosos tipos de péptidos de penetración celular para potenciar la entrega de genes y fármacos, e incluyen AntP, TAT, GALA, melitina de abeja y péptidos similares (Medina-Kauwe, 2006; Medina-Kauwe et al., 2005). Análogamente, se ha añadido la actividad de direccionamiento nuclear a agentes de entrega de genes a través de la anexión de diferentes dominios polibásicos tales como la NLS SV40, HMG-1, protamina y péptidos o proteínas similares (Medina-Kauwe, 2006; Medina-Kauwe et al., 2005). Si bien cada uno de estos péptidos posee la capacidad de penetrar en las membranas celulares o dirigirse a compartimentos intracelulares, incluyendo el núcleo, sus actividades se alteran cuando se acoplan covalentemente con otra molécula o se expresan como una proteína de fusión con otra molécula. Además, el ensayo de cada variante diferente de estos péptidos consume mucho tiempo y requiere mucho trabajo. Por tanto, si bien el diseño racional y los ensayos empíricos son la solución existente para este problema, este enfoque tiene sus limitaciones.

- 30 La invención que se describe en el presente documento elude el tiempo y el esfuerzo necesarios para el diseño racional y los ensayos empíricos de las proteínas/péptidos de penetración celular/tráfico intracelular mediante el uso de presión selectiva para aislar proteínas mutantes que han adquirido una penetración celular, un tráfico intracelular y/u una orientación subcelular mejorados. Las proteínas mutantes derivadas de este proceso tienen ventajas únicas sobre las proteínas parentales o las proteínas de entrega de genes/fármacos existentes actualmente en uso debido a las características mejoradas adquiridas a través de la evolución artificial/presión selectiva. Finalmente, las proteínas específicas aisladas mediante el proceso que se describe a continuación proporcionarán una ventaja sobre los péptidos de penetración celular existentes debido a sus características mejoradas de tráfico y lisis de membrana. Por tanto, pueden usarse para aumentar la entrega de genes y fármacos y, por tanto, potenciar la eficacia terapéutica de partículas utilizadas en la nanomedicina.

- 40 La invención proporciona un método para producir una molécula de entrega de fármacos que se dirige a un orgánulo. El método incluye las etapas de (a) obtener un polinucleótido que codifique un gen de base de pentona de adenovirus humano y generar mutantes del polinucleótido; (b) clonar los polinucleótidos mutantes en vectores de fagos y generar una biblioteca de fagos que comprenda los vectores de fagos; (c) transformar células con la biblioteca de fagos; (d) fraccionar las células transformadas y recoger el orgánulo de las células transformadas; (e) amplificar los fagos del orgánulo recogido; (f) transformar células con los fagos amplificados del orgánulo recogido; (g) repetir las etapas (d), (e) y (f); (h) titular los fagos de los orgánulos recogidos; (i) seleccionar los fagos con el título más alto y obtener las secuencias del polinucleótido mutante a partir de los fagos; y (j) producir un polipéptido mutante codificado por una de las secuencias de polinucleótidos mutantes.

- 50 En algunas realizaciones, el orgánulo se selecciona entre el grupo que consiste en mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, núcleo, ribosomas, membrana plasmática y citosol. Las células pueden ser células de mamífero o no son de mamífero. Los mutantes pueden generarse usando cualquier método de mutagénesis aleatoria o método de mutagénesis dirigida. Los ejemplos de métodos que pueden usarse para generar mutantes incluyen, pero no se limitan a, uno o más de entre métodos basados en PCR, mutagénesis química, mutagénesis inducida por radiación ultravioleta o una combinación de los mismos. Las mutaciones en el gen de la base de pentona pueden ser una o más de entre inserciones, supresiones, sustituciones o una combinación de las mismas.

En una realización de la invención, la molécula de entrega de fármacos comprende un dominio de direccionamiento, un dominio de ligando endosomolítico y un dominio cargado positivamente.

- 60 La invención también proporciona un polipéptido para entregar un agente terapéutico a un orgánulo de una célula como se define en las reivindicaciones. La mutación en el gen de la base de pentona puede aislarse a) obteniendo un polinucleótido que codifique el gen de la base de pentona y generando mutantes del polinucleótido; (b) clonar el polinucleótido mutante en un vector de fago y generar una biblioteca de fagos que comprenda los vectores de fagos; (c) transformar células con la biblioteca de fagos; (d) fraccionar las células transformadas y recoger el orgánulo de las células transformadas; (e) amplificar los fagos de los orgánulos recogidos; (f) transformar células con los fagos amplificados del orgánulo recogido; (g) repetir las etapas (d), (e), (f) y (g); (h) titular los fagos de los orgánulos

recogidos en cada ronda; (i) seleccionar los fagos con el título más alto y obtener las secuencias del polinucleótido mutante del fago; y (j) producir polipéptidos codificados por las secuencias, en los que los polipéptidos son las moléculas de entrega de fármacos que se dirigen a orgánulos. El polipéptido comprende adicionalmente un motivo de polilisina y un dominio de direccionamiento, por ejemplo, el dominio de direccionamiento de heregulina.

La invención proporciona adicionalmente un agente terapéutico que comprende el polipéptido como se define en las reivindicaciones y un fármaco terapéutico. Un fármaco terapéutico puede ser cualquier fármaco que, por ejemplo, trate, inhiba, prevenga, mitigue los efectos de, reduzca la gravedad, reduzca la probabilidad de desarrollar, disminuya la progresión y/o cure una enfermedad. Las enfermedades abordadas por los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, carcinomas, sarcomas, linfomas, leucemia, tumores de células germinales, blastomas, antígenos expresados en diversas células inmunitarias y antígenos expresados en células asociadas a diversas enfermedades hemáticas, enfermedades autoinmunitarias y/o enfermedades inflamatorias. Los agentes terapéuticos pueden ser un agente quimioterápico.

También se desvela en el contexto de la presente invención un método de producción de un transportador sin actividad proliferativa. El método comprende (a) obtener un polinucleótido que codifique el dominio de unión al receptor de heregulina (Her) y que genere mutantes en el polinucleótido; (b) clonar los polinucleótidos de Her mutantes en vectores de fagos y generar una biblioteca de fagos que comprenda los vectores de fagos; (c) transformar células MDA-MB-435 con la biblioteca de fagos en presencia de inhibidores mitóticos; (por ejemplo taxol); (d) fraccionar la célula transformada y extraer la fracción de membrana de las células MDA-MB-435; (e) recoger fagos de membrana de la fracción de membrana; (f) transformar los fagos de membrana en células MDA-MB-435 en presencia de inhibidores mitóticos; (g) repetir las etapas (d), (e) y (f); (h) controlar la proliferación de células MDA-MB-435 en cada ronda y seleccionar los fagos de membrana con la proliferación más baja de células MDA-MB-435; (i) obtener las secuencias de los mutantes polinucleotídicos de Her en los fagos de membrana seleccionados; y (j) producir polipéptidos codificados por las secuencias de Her y el gen de la base de pentona, en los que los polipéptidos son el transportador sin actividad proliferativa. Las mutaciones en el gen Her pueden ser una o más inserciones, supresiones, sustituciones o una combinación de las mismas.

La invención proporciona adicionalmente un polipéptido como se define en las reivindicaciones para entregar productos terapéuticos al núcleo, que comprende un polipéptido codificado por las secuencias de Her mutantes en las que el Her mutante se obtiene de acuerdo con el método descrito anteriormente. El polipéptido como se define en las reivindicaciones comprende adicionalmente un polipéptido que codifica proteína de base de pentona y un motivo de polilisina. La proteína de base de pentona es una proteína mutante como se define en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Aislamiento de mutantes potenciadores del tráfico

Anteriormente, se desarrolló una proteína de base de pentona de adenovirus recombinante para dirigir y entregar una diversidad de moléculas terapéuticas a células tumorales in vitro e in vivo (Agadjanian et al., 2012; Agadjanian et al., 2009; Agadjanian et al., 2006; Medina-Kauwe et al., 2001a; Medina-Kauwe et al., 2001b; Rentsendorj et al., 2008). Actualmente, la proteína recombinante de base de pentona (la misma que comprende el dominio 'PB' de HerPBK10, utilizado para dirigir productos terapéuticos a células tumorales HER2+; Agadjanian et al., 2012; Agadjanian et al., 2009; Agadjanian et al., 2006; Medina-Kauwe et al., 2001b; Rentsendorj et al., 2008) avanza a través de múltiples vías de entrada celular después de la unión celular, algunas de las cuales, pero no todas, apoyan la penetración de la membrana y la entrada en el citosol (Rentsendorj et al., 2006). Para mejorar esta función y potenciar la entrega y la penetración de los productos terapéuticos en dianas celulares, se usó un enfoque de evolución dirigida para aislar variantes de base de pentona con una actividad de penetración celular potenciada mediante el uso de acumulación nuclear como lectura, ya que el escape endosómico permite la entrada en el núcleo (Rentsendorj et al., 2006).

Procedimientos: Este proceso de dos etapas implica: 1. La creación de una biblioteca mutante a través de mutagénesis aleatoria y 2. La introducción de una presión selectiva para aislar variantes con función mejorada, dependiendo del proceso de selección. En este caso, el aislamiento de los fagos que sobreviven a la entrada en el citosol y/o núcleo servirá como la presión selectiva, que se espera que produzca variantes con una actividad de penetración celular potenciada (resumido en la Fig. 1). En consecuencia, los inventores han mutagenizado aleatoriamente el gen de la base de pentona y han generado una biblioteca de mutantes clonados en un vector de fago K₁₇. Basándose en estudios de evolución dirigida establecidos anteriormente (Cherry et al., 1999; Shafikhani et al., 1997; Wan et al., 1998; You y Arnold, 1996), los inventores buscaron una frecuencia de mutación de 1-4 cambios de aminoácidos (o 2-7 cambios de nucleótidos) por gen. Basándose en el rendimiento del producto usando un método especializado de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (GeneMorphil Random Mutagenesis Kit; Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.), los inventores consiguieron una frecuencia de mutación estimada de ~8 nucleótidos/kb o 13,6 nucleótidos por gen de base de pentona (Fig. 2). Los inventores

insertaron este producto en un vector de fago T7-Select y empaquetaron el fago recombinante para producir un título de biblioteca amplificada de 5×10^{10} ufp/ml.

La biblioteca se seleccionó en células HeLa (que expresan receptores de integrinas para la unión y la captación de la proteína PB). Se incubaron fagos en las células a 4 °C durante 1 h para promover la unión al receptor, pero no la captación, después las células se lavaron y se incubaron durante 2 horas a 37 °C para promover la internalización. Después de la captación, las células recogidas se sometieron a fraccionamiento para aislar fracciones citosólicas y nucleares. Los fagos amplificados a partir de cada fracción después se sometieron a bioselección repetida y las fracciones secuenciales correspondientes se extrajeron de las células recogidas (es decir, se amplificaron fagos nucleares aislados de la ronda 1 y se añadieron nuevamente a las células, seguido del aislamiento repetido de las fracciones nucleares para volver a obtener el fago nuclear). Después de dos o tres rondas de bioselección, se tituló el fago aislado de cada fracción repetida para determinar el enriquecimiento relativo del fago nuclear/citosólico de la biblioteca mutagenizada en comparación con el fago que muestra la base de pentona de tipo silvestre.

Resultados: El fago parental no mutagenizado, T7-PB, produjo una relación de títulos de fagos nucleares/citosólicos de menos de 1, lo que indica que la relación de fagos que llegan al núcleo en 2 h fue inferior a la relación de fagos que permanecieron en el citoplasma (Fig. 3). Por el contrario, después de 2 rondas de bioselección y aislamiento de fagos nucleares (3-3a), se observó un cambio hacia una mayor acumulación nuclear en comparación con la retención citoplásmica, con un aumento significativo en comparación con T7-PB ($P = 0,05$) (Fig. 3). Incluso los fagos aislados de 3 rondas de selección de fracciones citosólicas (1-1-1) mostraron un aumento relativo, aunque no altamente significativo ($P = 0,07$) en la partición nuclear en comparación con T7-PB (Fig. 3).

Después de tres rondas de bioselección y aislamiento de mutantes citosólicos y nucleares, los inventores secuenciaron clones seleccionados aleatoriamente de cada población enriquecida y descubrieron que la mayoría de los clones aislados de las fracciones tanto citosólica como nuclear codificaban la proteína truncada carboxi-[C-] terminal (Fig. 4). Los motivos de unión a integrinas 287LDV y 340RGD localizados cerca de la mitad de la secuencia lineal de la base de pentona de tipo silvestre (PB ts) no se conservaron en la mayoría de los clones truncados. Uno de los mutantes truncados contiene el motivo LDV, pero no el RGD, mientras que los truncamientos restantes carecen de los motivos tanto LDV como RGD. Los clones de longitud completa aislados a partir de la bioselección conservan los motivos tanto LDV como RGD, pero también contienen varias mutaciones puntuales que introducen cambios potenciales de aminoácidos que alteran la función (Fig. 4). Entre estos están un reemplazo Leu60Trp en el clon de la fracción citosólica 111C; y cambios de aminoácidos Lys375Glu, Val449Met y Pro469Ser en el clon de fracción nuclear 333F. Para someter a ensayo la capacidad de cada variante aislada para transmitir una penetración citosólica y/o nuclear potenciada, el tráfico intracelular de cada uno se comparará con la proteína original mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal y se confirmará mediante fraccionamiento subcelular. Específicamente, como los mutantes de longitud completa (111C y 333F) y el mutante 331J conservan los motivos de unión a integrinas, estas variantes se someten a ensayo en comparación con PB ts, ya que se predice que entrarán en las células a través de la unión y captación de integrinas. Mientras tanto, como las variantes truncadas restantes carecen de cualquier motivo de unión al receptor, éstas se insertarán en HerPBK10 para reemplazar el dominio PB y se someterán a ensayo en comparación con HerPBK10 parental, que entra en las células a través de la unión y la captación del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER).

Ejemplo 2

Aislamiento de mutantes de unión al receptor y endocitosis con señalización truncada

Justificación: La proteína de penetración celular dirigida al tumor, HerPBK10, se dirige específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER) a través de la inclusión del dominio de unión al receptor de heregulina, designado en el presente documento como el dominio 'Her' de HerPBK10 (Medina-Kauwe et al., 2001b). Sin embargo, la ligadura de los receptores de heregulina puede inducir una señalización que puede dar como resultado la proliferación, diferenciación y, en algunos casos, la apoptosis de las células tumorales, dependiendo de varios factores, incluyendo la relación de heterodímeros receptores, el subtipo de ligando, el tipo celular y la presencia de determinadas moléculas intracelulares (Aguilar et al., 1999; Lewis et al., 1996; Weinstein et al., 1998). La posibilidad de inducir efectos adversos, tales como la progresión tumoral, conduce a examinar si la presión selectiva introducida por los inhibidores mitóticos puede seleccionar la unión al receptor y mutantes de endocitosis que carezcan de señalización proliferativa. Los inventores propusieron someter a ensayo este enfoque generando una biblioteca de fagos que muestre variantes de Her y cribando la biblioteca para internalizar las especies de Her que carezcan de señal proliferativa mediante el aislamiento del fago internalizado de las células quiescentes y re seleccionando las células de cáncer de mama humano que no proliferen.

Procedimiento: Se producirá una biblioteca de secuencias de Her que contenga mutaciones diferentes distribuidas a través de la secuencia de codificación mediante PCR propensa a errores y extensión escalonada, lo que implica ciclos repetidos de desnaturalización y breve hibridación/extensión después del cebado inicial de las secuencias molde (Zhao et al., 1998). La biblioteca resultante se insertará en los brazos de vector apropiados para transferirla al bacteriófago T7Select (que se desarrolla para presentar proteínas completas) y el fago recombinante producido siguiendo las instrucciones del fabricante (Novagen, Gibbstown, NJ, EE.UU.). Basándose en la bioselección de las

cápsides de VAA evolucionadas, se añadirá un título inicial de 10^{12} fagos a las células MDA-MB-435 mantenidas en medios que contengan inhibidores mitóticos tales como taxol y aproximadamente 30-45 minutos más tarde (el tiempo necesario para la unión e internalización; Medina-Kauwe et al., 2000) las células se recogerán mediante tripsina/EDTA (para retirar el fago no internalizado) y se extraerán con membrana para aislar la fracción de vesícula del virus en bruto (Qproteome Plasma Membrane Protein Kit, Qiagen Inc., Valencia, CA, EE.UU.), que después puede aislarse mediante bandas de CsCl. Se realizarán de tres a cuatro rondas de selección (es decir, adición de virus aislados a células recién preparadas y repetición de la extracción con membrana) y los virus aislados se caracterizarán de las siguientes maneras. En primer lugar, se fijarán células recién preparadas que reciban virus enriquecidos y se procesarán para inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-fago (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.) para confirmar que el fago aislado todavía se internaliza. Se evaluarán células separadas tratadas en paralelo para determinar la tasa de proliferación en comparación con células simuladas y sin tratar, mediante un ensayo metabólico. En segundo lugar, la secuencia de Her del fago aislado se escindirán e insertará en un vector de expresión bacteriana para la producción de proteína recombinante (Medina-Kauwe et al., 2001a), después el mutante Her se sometió a ensayo para determinar la internalización y la actividad proliferativa en células de cáncer de mama humano MDA-MB-435 como se ha descrito anteriormente, en comparación con Her parental, así como en células simuladas y sin tratar. Los clones mutantes se secuenciarán para identificar las regiones mutadas y se insertarán de nuevo en el casete de expresión de HerPBK10, reemplazando el 'Her' parental.

Los diversos métodos y técnicas descritos anteriormente proporcionan varias formas de realizar la solicitud. Por supuesto, ha de entenderse que no necesariamente todos los objetivos o ventajas descritos pueden conseguirse de acuerdo con cualquier realización particular descrita en el presente documento. De este modo, por ejemplo, los expertos en la materia reconocerán que los métodos pueden realizarse de una manera que consiga u optimice una ventaja o un grupo de ventajas como se enseña en el presente documento sin conseguir necesariamente otros objetivos o ventajas como se enseña o se sugiere en el presente documento. En el presente documento se menciona una diversidad de alternativas. Ha de entenderse que algunas realizaciones preferidas incluyen específicamente una, otra o varias características, mientras que otras excluyen específicamente una, otra o varias características, mientras que otras más mitigan una característica particular mediante la inclusión de una, otra o varias características ventajosas.

Además, el experto en la materia reconocerá la aplicabilidad de diversas características de diferentes realizaciones. De forma similar, los diversos elementos, características y etapas analizados anteriormente, así como otros equivalentes conocidos para cada uno de dichos elementos, características o etapas, pueden emplearse en diversas combinaciones por un experto en la materia para realizar métodos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. Entre los diversos elementos, características y etapas, algunos se incluirán específicamente y otros se excluirán específicamente en diversas realizaciones.

En algunas realizaciones, los términos "un", "una", "el" y "la" y referencias similares utilizadas en el contexto de describir una realización particular de la solicitud (especialmente en el contexto de algunas de las siguientes reivindicaciones) pueden interpretarse como que incluyen tanto lo singular como lo plural. La indicación de intervalos de valores en el presente documento pretende servir simplemente como un método abreviado que se refiere individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual se incorpora a la memoria descriptiva como si se hubiera indicado individualmente en el presente documento. Todos los métodos que se describen en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o expresión de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionada con respecto a determinadas realizaciones en el presente documento, tiene por objeto meramente iluminar mejor la solicitud y no representa una limitación en el alcance de la solicitud reivindicada de otro modo. Ninguna frase en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica un elemento no reivindicado esencial para la puesta en práctica de la solicitud.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido para entregar un agente terapéutico a un orgánulo de una célula, que comprende un polipéptido de base de pentona (PB) de adenovirus, en el que:
 - 5 el polipéptido de base de pentona comprende el polipéptido de base de pentona indicado en la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 20; o
 - el polipéptido de base de pentona consiste en el polipéptido de base de pentona indicado en la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 18; o
 - el polipéptido de base de pentona es un polipéptido de base de pentona de adenovirus humano de tipo 5 que
 - 10 comprende una mutación Leu60Trp; o
 - el polipéptido de base de pentona es un polipéptido de base de pentona de adenovirus humano de tipo 5 que comprende una mutación Lys375Glu, una mutación Val449Met y una mutación Pro469Ser.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de base de pentona comprende el polipéptido de base de pentona indicado en la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 20.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de base de pentona consiste en el polipéptido de base de pentona indicado en la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 18.
4. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de base de pentona es un polipéptido de base de pentona de adenovirus humano de tipo 5 que comprende una mutación Leu60Trp.
5. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de base de pentona es un polipéptido de base de pentona de adenovirus humano de tipo 5 que comprende una mutación Lys375Glu, una mutación Val449Met y una mutación Pro469Ser.
6. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido se dirige al citoplasma o núcleo de la célula.
7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la célula es una célula tumoral.
8. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, en el que el polipéptido comprende el polipéptido de base de pentona y un motivo de polilisina.
9. El polipéptido de la reivindicación 8, en el que el polipéptido comprende adicionalmente un dominio de direccionamiento de heregulina.
10. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, en el que el polipéptido comprende el polipéptido de base de pentona y un dominio de direccionamiento de heregulina.
11. Un agente terapéutico que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la composición comprende adicionalmente un fármaco terapéutico.
12. El agente terapéutico de la reivindicación 11, en el que el fármaco terapéutico es un agente quimioterápico o un gen.
13. Un método para producir una molécula de entrega de fármaco que se dirige a un orgánulo que comprende:
 - (a) obtener un polinucleótido que codifique un gen de base de pentona (PB) de adenovirus humano y generar
 - 50 mutantes del polinucleótido;
 - (b) clonar los polinucleótidos mutantes en vectores de fagos y generar una biblioteca de fagos que comprenda los vectores de fagos;
 - (c) transformar células con la biblioteca de fagos;
 - (d) fraccionar las células transformadas y recoger el orgánulo de las células transformadas;
 - 55 (e) amplificar los fagos del orgánulo recogido;
 - (f) transformar células con los fagos amplificados del orgánulo recogido;
 - (g) repetir las etapas (d), (e) y (f);
 - (h) titular los fagos del orgánulo recogido;
 - (i) seleccionar los fagos con el título más alto y obtener las secuencias del polinucleótido mutante de los fagos; y
 - 60 (j) producir un polipéptido mutante codificado por una de las secuencias de polinucleótidos mutantes.
14. El método de la reivindicación 13, en el que el orgánulo se selecciona entre el grupo que consiste en mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, núcleo, ribosomas, membrana plasmática y citosol.
15. El método de la reivindicación 13, en el que
 - (a) las células son de mamíferos; o

- (b) las células no son células de mamíferos; o
 - (c) en el que los mutantes se generan usando uno cualquiera o más de entre métodos basados en PCR, mutagénesis química, mutagénesis inducida por ultravioleta o una combinación de los mismos; o
 - (d) en el que la molécula de entrega de fármaco comprende adicionalmente un dominio de direccionamiento y un dominio cargado positivamente.
- 5

Figura 1

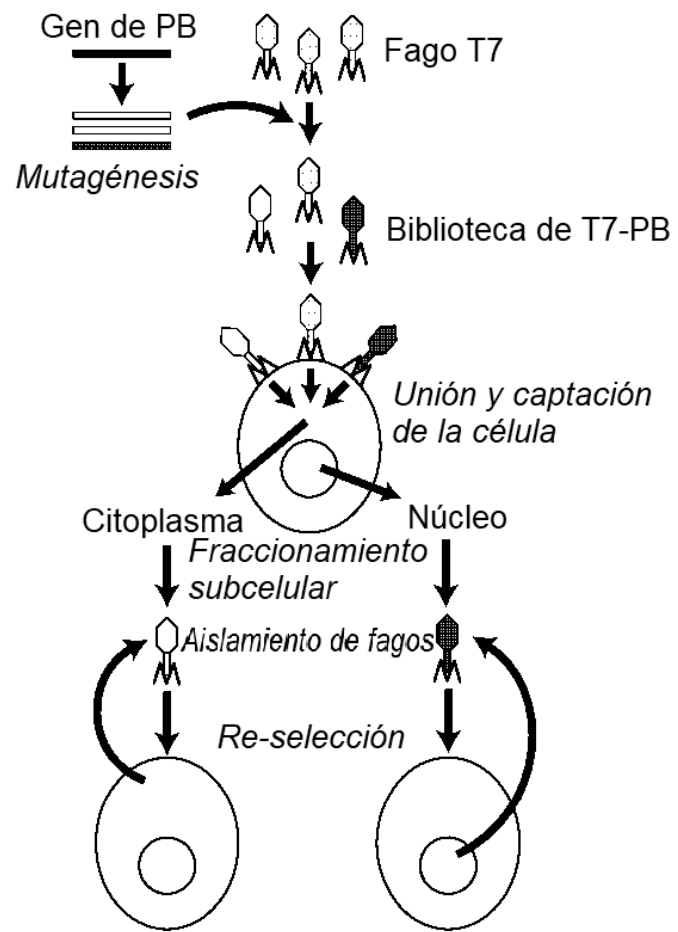


Figura 2

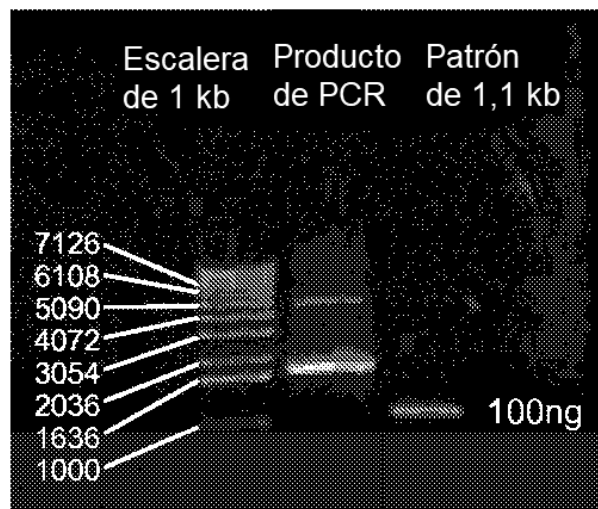


Figura 3

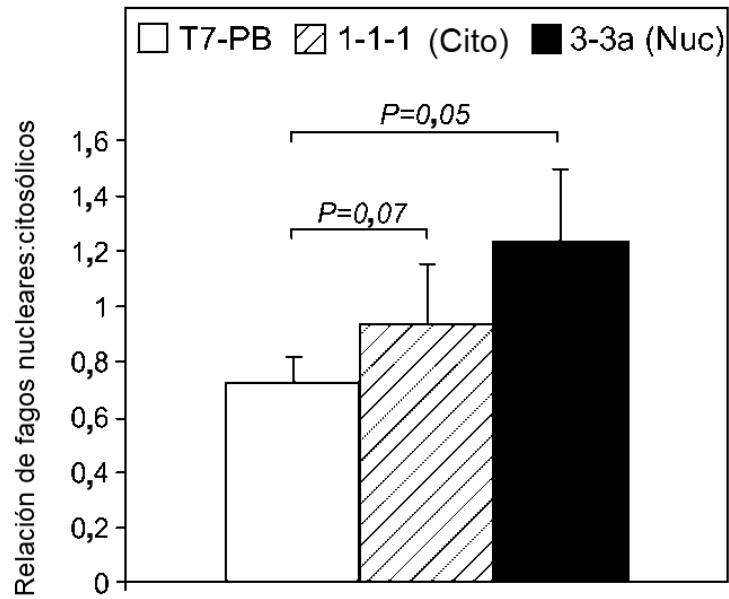


Figura 4

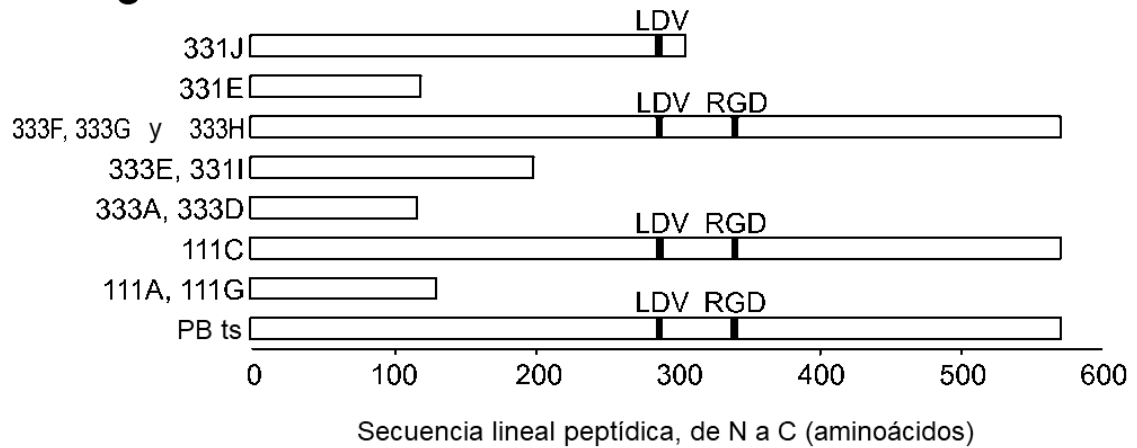


Figura 5

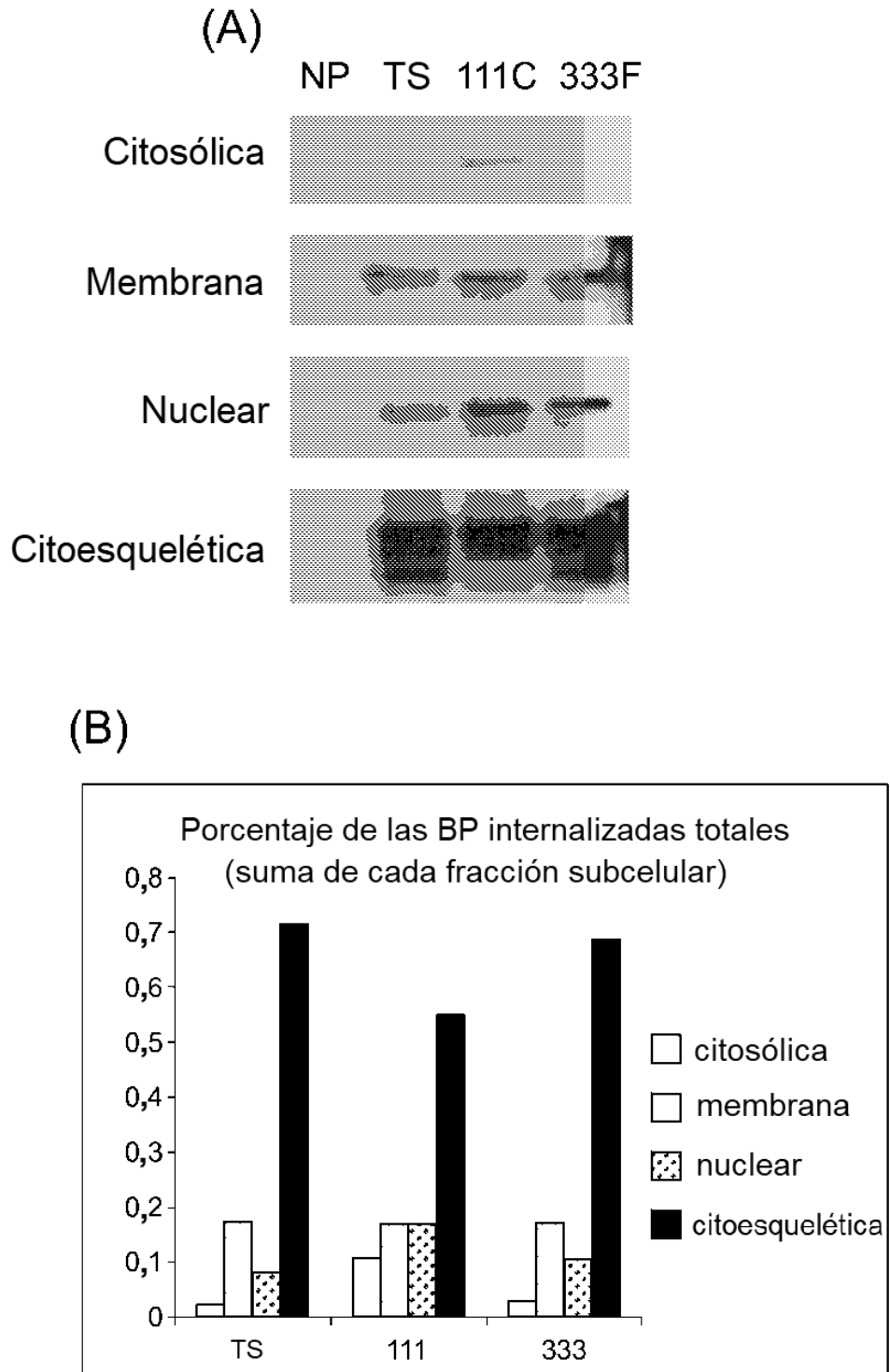


Figura 6

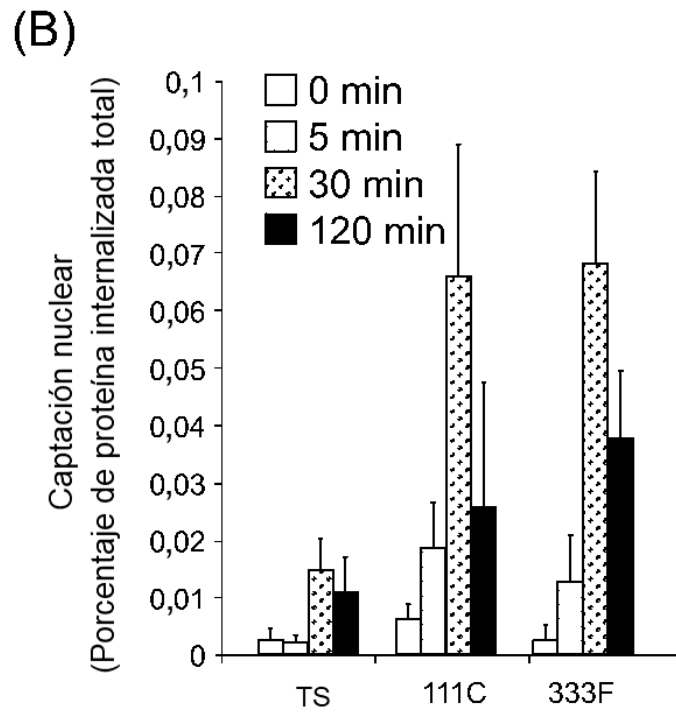
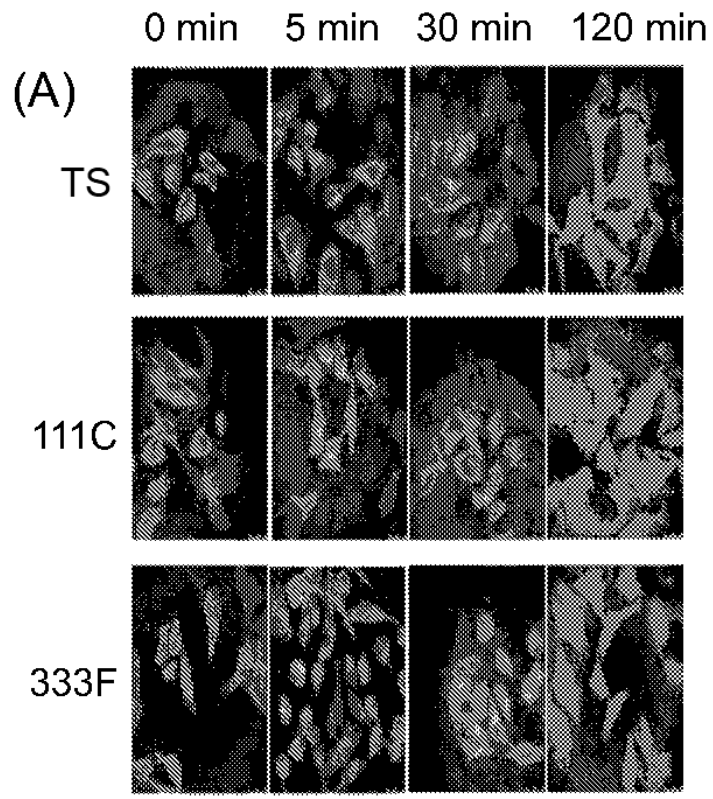


Figura 7

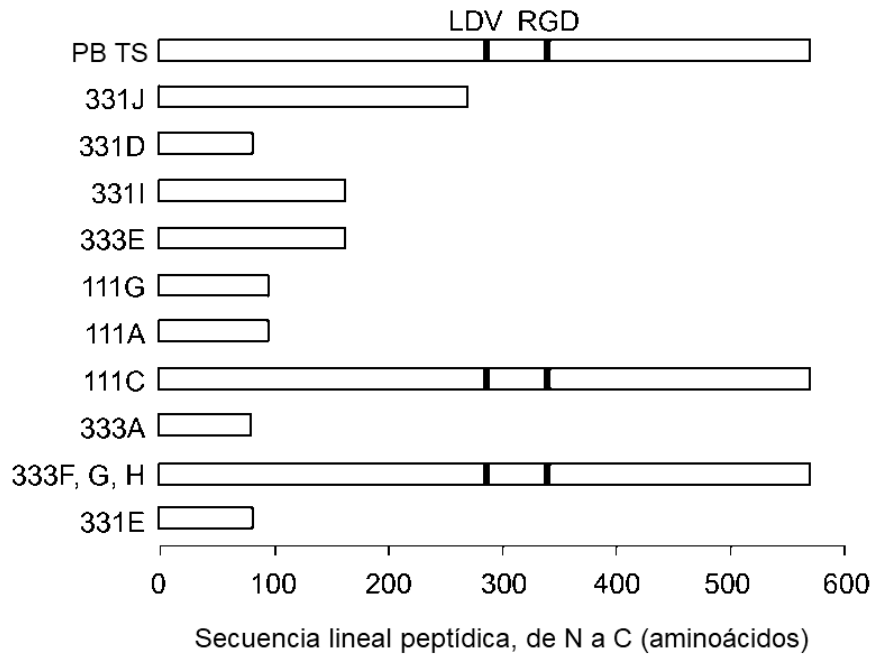


Figura 8

Secuencia de ácido nucleico:

```

TTTTGTTTACTTTTAAGAAGGAGATATACAT
ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG
ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT
AAG GAT CGA TGG GGT TCC ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA
GGT CCT CCT CCC TCC TAC GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG
GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG
TTT GTG CCT CCG CGG TAC CTG CGG CCT ACC GGG GGG AGA AAC AGC
ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC ACC CGT GTG
TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GAT GTG GCA TCC CTG AAC TAC
CAG AAC GAC CAC AGC AAC TTT CTG ACC ACG GTC ATT TAA AAC AAT
GAC TAC AGC CCG GGG GAG GCA AGC ACA CAG ACC ATC AAT CTT GAC
GAC CGG TCG CAC TGG GGC GGT GAC CTG AAA ACC ATC CTG CAT ACC
AAC ATG CCA AAT GTG AAC GAG TTC ATG TTT ACC AAT AAG TTT AAG
GCG CGG GTG ATG GTG TCG CGC TTG CCT ACT AAG GAC AAT CAG GTG
GAG CTG AAA TAC GAG TGG GTG GAG TTC ACG CTG CCC GAG GGC AAC
TAC TCC GAG ACC ATG ACC ATA GAC CTT ATG AAC AAC GCG ATC GTG
GAG CAC TAC TTG AAA GTG GGC AGA CAG AAC GGG GTT CTG GAA AGC
GAC ATC GGG GTA AAG TTT GAC ACC CGC AAC TTC AGA CTG GGG TTT
GAN CAC GTC ACT GGT CTT GTC ATG CCT GGG GTA TAT ACA AAC GAA
GCC NNC CAT CCA GAC ATC ATT TTG CTG CCA GGA TGC GGG GTG GAC
TTC ACC CAC AGC CGC CTG AGC AAC TTG TTG GGC ATC CGC AAG CGG
CAA CCC TTN CAG GAN GGC TTT AGG ATC NNC NAC GAT GAT CTG GAG
GGT GGT ANC ATT CCC GCA CTG (SEQ ID NO: 1).

```

Bases en mayúsculas y en cursiva indican mutaciones de PB de tipo silvestre

Mutaciones

Base 397 (289 ts) C > T, Glutamina > Codón de parada

Base 471 (363 ts) C > T, Glicina > Glicina

Secuencia de aminoácidos prevista:

MRRAAMYEEGPPPSYESVVSAAAPVAAALGSPFDAPLDPPFVPPRYLRPTGGRNSIRYS
ELAPLFDTTTRVYLVDNKSTDVASLNYQNDHSNFLTTVI (SEQ ID NO: 2)

Número de aminoácidos: 96

Peso molecular: 10531,8

pI teórico: 5,15

Figura 9

Secuencia de ácido nucleico:

TTTAAGAAGGAGANATACAT

```

ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG
ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT
AAG GAT CGA TGG GGA TCC ACG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA
GGT CCT CCT CCC TCC TAC GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG
GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG
TTT GTG CCT CCG CGG TAC CTG CGG CCT ACC GGG GGG AGA AAC AGC
ATC CGT TAC TCT GAG TGG GCA CCC CTA TTC GAC ACC ACC CGT GTG
TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GAT GTG GCA TCC CTG AAC TAC
CAG AAC GAC CAC AGC AAC TTT CTG ACC ACG GTC ATT CAA AAC AAT
GAC TAC AGC CCG GGG GAG GCA AGC ACA CAG ACC ATC AAT CTT GAC
GAC CGG TCG CAC TGG GGC GGC GAC CTG AAA ACC ATC CTG CAT ACC
AAC ATG CCA AAT GTG AAC GAG TTC ATG TTT ACC AAT AAG TTT AAG
GCG CGG GTG ATG GTG TCG CGC TTG CCT ACT AAG GAC AAT CAG GTG
GAG CTG AAA TAC GAG TGG GTG GAG TTC ACG CTG CCC GAG GGC AAC
TAC TCC GAG ACC ATG ACC ATA GAC CTT ATG AAC AAC GCG ATC GTG
GAG CAC TAC TTG AAA GTG GGC AGA CAG AAC GGG GTT CTG GAA AGC
GAC ATC GGG GTA AAG TTT GAC ACC CGC AAC TTC AGA CTG GGG TTT
GAC CCC GTC ACT GGT CTT GTC ATG CCT GGG GTA TAT ACA AAC GAA
GCC TTC CAT CCA GAC ATC ATT TTG CTG CCA GGA TGC GGG GTG GAC
TTC ACC CAC AGC CGC CTG ANC AAC TTG TTG GGC ATC CGC AAG CGG
CAN CCC TTC CAG GAG GNN TTT AGG ATC ANC NAC GAT GAT CNG GAG
GGN NGN ANN ATN CCC GCA CTG (SEQ ID NO: 3)

```

Bases en mayúsculas y en cursiva indican mutaciones de PB de tipo silvestre

Mutaciones

Base 110 (2 ts) T > C, Metionina > Treonina

Base 179 (71 ts) T > G, Leucina > Triptófano

Base 1044 C > T, Serina > Serina

Base 1518 G > A, Valina > Valina

Secuencia de aminoácidos prevista:

```

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSTRRAAMYEEGPPPSYES
VVSAAPVAAALGSPFDAPLDPPFVPPRYLRPTGGRNSIRYSEWAPLFDTRVYLVN
KSTDVASLNYQNDHSNFLTTVIQNNDYSPGEASTQTINLDDRSHWGGDLKTILHTNM
PNVNEFMFTNKFARVMVSR LPTKDNQVELKYEWVEFTLPEGNYSETMTIDLMNN
AIVEHYLKVGRQNGVLESDIGVKFDRNFR LGFDPVTGLVMPGVYTNEAFHPDIILLP
CGGVDFTHSRLXNLLGIRKRXPFQEXFRIXDDXEXXXPAL (SEQ ID NO: 4)

```

Figura 10

Secuencia de ácido nucleico:

TTTACTTTAAGAAGGAGANATACAT

```

ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT
GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG
ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA GGT CCT CCT CCC TCC TAC
GAG AGT GCG GTG AGC GCG GCG CCA GTG GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC
GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG TTT GTG CCT CCG GAG TAC CTG CGG CCT ACC
GGG GGG AGA AAC AGC ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC
ACC CGT GTG TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GAT GTG GCA TCC CTG AAC
TAC CAG AAC GAC CAC AGC AAC TTT CTG ACC ACG GTC ATT TAA AAC AAT GAC
TAC AGC CCG GGG GAG GCA AGC ACA CAG ACC ATC AAT CTT GAC GAC CGG TCG
CAC TGG GGC GGC GAC CTG AAA ACC ATC CTG CAT ACC AAC ATG CCA AAT GTG
AAC GAG TTC ATG TTT ACC AAT AAG TTT AAG GCG CGG GTG ATG GTG TCG CGC
TTG CCT ACT AAG GAC AAT CAG GTG GAG CTG AAA TAC GAG TGG GTG GAG TTC
ACG CTG CCC GAG GGC AAC TAA TCC GAG ACC ATG ACC ATA GAC CTT ATG AAC
AAC GCG ATC GTG GAG CAC TAC TTG AAA GTG GGC AGA CAG AAC GGG GTT CTG
GAA AGC GAC ATC GGG GTA AAG TTT GAC ACC CGC AAC TTC AGA CTG GGG TTT
GAC CAC GTC ACT GGT CTT GTC ATG CCT GGG GTA TAT ACA AAC GAA GCC TTC
CAT CCA GAC ATC ATT TTG CTG CCA GGA TGC GGG GTG GAC TTC ACC CAC AGC
CGC CTG ANC AAC TTG NTG GGC ATC CGC AAG CGG CAA CCN TTN CAG GAG GGC
TTT AGG ATC ANC TAC GAT GAT CTG GAG GGT G (SEQ ID NO: 5)

```

Bases en mayúsculas y en cursiva indican mutaciones del tipo silvestre

Mutaciones

Base 161 (53 ts) T > C, Valina > Alanina
 Base 398 (290 ts) C > T, Glutamina > Parada
 Base 633 (525 ts) C > A, Tirosina > Parada
 Base 780 (672 ts) C > A, Prolina > Histidina

Secuencia de aminoácidos:

MRRAAMYEEGPPPSYESAVSAAPVAAAALGSPFDAPLDPPFVPPRYLRPTGGRNSIRYSELAPL
 FDTTRVYLVNDKSTDVASLNYQNDHSNFLTTVI (SEQ ID NO: 6)

Número de aminoácidos: 96

Peso molecular: 10503,7

pI teórico: 5,15

Figura 11

Secuencia de ácido nucleico:

TTAAGAAGGAGANATACAT

```

ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT
GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG
CGA TGG ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA GGT CCT CCT CCC TAC TAC
GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG GCG GCG GCG CTG GGT TCT ACC TTC
GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG TTT GTG CCT CCG CGG TAC CTG CGG CCT ACC
GGG GGG AGA AAC AGC ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC
ACC CGT GTG TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GAT GTG GCA TCC CTG AAC
TAC TAG AAC GAC CAC AGC AAC TTT CTG ACC ACG GTC ATT CAA AAC AAT GAC
TAC AGC CCG GGG GAG GCA AGC ACA CAG ACC ATC AAT CTT GAC GAC CGG TCG
CAC TGG GGC GGC GAC CTG AAA ACC ATC CTG CAT ACC AAC ATG CCA AAT GTG
AAC GAG TTC ATG TAT ACC AAT AAG TTT AAG GCG CGG GTG ATG GTG TCG CGC
TTG CCT ACT AAG GAC AAT CAG GTG GAG CTG AAA TAC GAG TGG GTG GGG TTC
ACG CTG CCC GAG GGC AAC TAC TCC GAG ACC ATG ACC ATA GAC CTT ATG AAC
AAC GCG ATC GTG GAG CAC TAC TTG AAA GTG GGC AGA CAG AAC GGG GTT CTG
GAA AGC GAC ATC GGG GTA AAG TTT GAC ACC CGC AAC TTC AGA CTG NGG TTT
GAC CCC GTC ACT GGT CTT GTC ATG CCT GGG GTA TAT ACA AAC GAA GCC TTC
CAT CCA GAC ATC ATT TTG CTG CCA GGA TGN GGG GTG GNC TTC ACC CAC AGC
CGC CNG AGC AAC TTG TTG GGC ATC CGC AAG CNG CAA CCN TTC TAG GAG GGC
TTT ANG ATC ACC TAC NAT GAT CTG GAG GGN (SEQ ID NO: 7)

```

Mutaciones

Base 149 (41 ts) C > A, Serina > Tirosina
 Base 199 (91 ts) C > A, Prolina > Treonina
 Base 361 (253 ts) C > T, Glutamina > Parada
 Base 524 (416 ts) T > A Fenilalanina > Tirosina
 Base 608 (500 ts) A > G Glutamato > Glicina

Secuencia de aminoácidos prevista:

MRRAAMYEEGPPPYYESVVSAAAPVAAALGSTFDAPLDPPFVPPRYLRPTGGRNSIRYSELAPLFDTTT
 VYLVDNKSTDVASLNY (SEQ ID NO: 8)

Número de aminoácidos: 84

Peso molecular: 9241,4

pI teórico: 5,17

Figura 12

Secuencia de ácido nucleico:

TTTAAGAAGGAGANATACAT

ATG	CGG	GGT	TCT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	GGT	ATG	GCT	AGC	ATG
ACT	GGT	GGA	CAG	CAA	ATG	GGT	CGG	GAT	CTG	TAC	GAC	GAT	GAC	GAT
AAG	GAT	CGA	TGG	CGA	ATG	ATG	CGG	CGC	GCG	GCG	ATG	TAT	GAG	GAA
GGT	CCT	CCT	CCC	TCC	TAC	GAG	AGT	GTG	GTG	AGC	GCG	GCG	CCA	GTG
GCG	GCG	GCG	CTG	GGT	TCT	CCC	TTC	GAT	GCT	CCC	CTG	GAC	CCG	CCG
TTT	GTG	CCT	CCG	CGG	TAC	CTG	CGG	CCT	ACC	GGG	GGG	AGA	AAC	AGC
ATC	CGT	TAC	TCT	GAG	TTG	GCA	CCC	CTA	TTC	GAC	ACC	ACC	CGT	GTG
TAC	CTG	GTG	GAC	AAC	AAG	TCA	ACG	GAT	GTG	GCA	TCC	CTG	AAC	TAC
CAG	AAC	GAC	CAC	AGC	AAC	TTT	CTG	ACC	ACG	GTC	ATT	CAA	AAC	AAT
GAC	TAC	AGC	CCG	GGG	GAG	GCA	AGC	ACA	CAG	ACC	ATC	AAT	CTT	GAC
GAC	CGG	TCG	CAC	TGG	GGC	GGC	GAC	CTG	AAA	ACC	ATC	CTG	CAT	ACC
AAC	ATG	CCA	AAT	GTG	AAC	GAG	TTC	ATG	TTT	ACC	AAT	AAG	TTT	AAG
GCG	CGG	GTG	ATG	GTG	TCG	CGC	TTG	CCT	ACT	AAG	GAC	AAT	CAG	GTG
GAG	CTG	AAA	TAC	GAG	TAG	GTG	GAG	TTC	ACG	CTG	CCC	GAG	GGC	AAC
TAC	TCC	GAG	ACC	ATG	ACC	ATA	GAC	CTT	ATG	AAC	AAC	GCG	ATC	GTG
GAG	CAC	TAC	TTG	AAA	GTG	GGC	AGA	CAG	AAC	GGG	GTT	CTG	GAA	AGC
GAC	ATC	GGG	GTA	AAG	TTT	GAC	ACC	CGC	AAC	TTC	AGA	CTG	GGG	TTT
GAC	CCC	GTC	ACT	GGT	CTT	GTC	ATG	CCT	GGG	GTA	TAT	ACA	AAC	GAA
GCC	TTC	CAT	CCA	GAC	ATC	ATT	TTG	CTG	CCA	GGA	TGC	GGG	GTG	GNC
TTC	ACC	CAC	AGC	CGC	CTG	AGC	AAC	TTG	TTG	GGC	ATC	CNC	AAG	CNG
CAA	CCC	NTT	CCA	GGA	GGG	CTT	TAG	GAT	CAC	CTA	CGA	TGA	TCT	GGA
GGG	(SEQ ID NO: 9)													

Mutaciones

Base 602 (494 ts) G > A, Glutamina > Parada

Secuencia de aminoácidos prevista:

MRRAAMYEEGPPPSYESVVSAAAPVAAALGSPFDAPLDPPFVPPRYLRPTGGRNSIRYS
ELAPLFDTRVYLVNDKSTDVASLNYQNDHSNFLTTVIQNNDYSPGEASTQTINLDD
RSHWGGDLKTILHTNMPNVNEFMFTNKFARVMVSRLPTKDNQVELKYE (SEQ ID
NO: 10)

Número de aminoácidos: 164

Peso molecular: 18400,5

pI teórico: 5,58

Figura 13

Secuencia de ácido nucleico:

TTTAAGAAGGAGANATACAT

```

ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT
GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG
ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA GGT CCT CCT CCC TCC TAC
GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC
GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG TTT GTG CCT CCG CGA TAC CTG CGG CCT ACC
GGG GGG AGA AAC AGC ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC
ACC CGT GTG TAC CTG GTG GAC TAC AAG TCA ACG GAT GTG GCA TCC CTG AAC
TAC CAG AAC GAC CAC AGC AAC TTT CTG ACC ACG GTC ATT CAA AAC AAT GAC
TAC AGC CCG GGG GAG GCA AGC ACA CAG ACC ATC AAT CTT GAC GAC CGG TCG
CAC TGG GGC GGC GAC CTG AAA ACC ATC CTG CAT ACC AAC ATG CCA AAT GTG
AAC GAG TTC ATG TTT ACC AAT AAG TTT AAG GCG CGG GTG ATG GTG TCG CGC
TTG CCT ACT AAG GAC AAT CAG GTG GAG CTG AAA TAC GAG TGG GTG GAG TTC
ACG ATG CCC GAG GGC AAC TAC TCC GAG ACC ATG ACC ATA GAC CTT ATG AAC
AAC GCG ATC GTG GAG CAC TAC TTG AAA GTG GGC AGA CAG AAC GGG GTT CTG
GAA AGC GAC ATC GGG GTA AAG TTT GAC ACC CGC AAC TTC AGA CTG GGG TTT
GAC CCC GTC ACT GGT CTT GTC ATG CCT GGG GTA TAT ACA AAC GAA GCC NTC
CAT CCA GAC ATC ATT TTG CTG CCA GGA TGC GGG GTG NAC TTC ACC CAC AGC
CGC CTG AGC AAC TTG TTG GGC ATC CGC AAG CGG CAA CCC NTN CCA GGA GGG
CTT TAG GNT CAC CTA CGA TGA TCT GGA GGG NTG GNA NCA TTC CCG CNC TGT
CTG CCA GGA TGC GGG GTG GAC TTC ACC CAC AGC CGC CTG AGC AAC TTG TTG
GGC ATC CGC AAG CGG CAA CCC TT CCA GGA GGG CTT TAG GAT CAC CTA C

```

(SEQ ID NO: 11)

Mutaciones

Base 285 (178 ts) A > G, Arg > Arg

Base 328 (220 ts) A > T, Asn > Tyr

Base 616 (508 ts) C > A, Leu > Met

Secuencia de aminoácidos prevista:

MRRAAMYEEGPPPSYESVVSAAAPVAAALGSPFDAPLDPPFVPPRYLRPTGGRNSIRYSELAPL
 FDTTRVYLV DYKSTDVASLNYQNDHSNFLT TVIQNNDYSPGEASTQTINLDDRSHWGGDLK
 TILHTNMPNVNEFMFTNKF KARVMVSR LPTKDNQVELKYEWVEFTMPEGNYSETMTIDLMN
 NAIVEHYLKVGRQNGVLES DIGVKFDTRN FRLGFD PVTGLVMPGVYTNEAXHPDIILLPGCG
 VXFTHSRLSNLLGIRKRQXP GGL (SEQ ID NO: 12)

Número de aminoácidos: 271

Peso molecular: 30339,9

pI teórico: 5,70

Figura 14

Secuencia de ácido nucleico:

TTTAAGAAGGAGANATACAT

```

ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT
GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG
ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA GGT CCT CCT CCC TCC TAC
GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC
GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG TTT GTG CCT CCG CGG TAC CTG CGG CCT ACC
GGG GGG AGA AAC AGC ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC
ACC CGT GTG TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GTG TGG CAT CCC TGA ACT
ACC AGA ACG ACC ACA GCA ACT TTC TGA CCA CGG TCA TTC AAA ACA GTG ACT
ACA GCC CGG GGG AGG CAA GCA CAC AGA CCA TCA ATC TTG ACG ACC GGT CGC
ACT GGG GCG GCG ACC TGA AAA CCA TCC TGC ATA CCA ACA TGC CAA ATG TGA
ACG AGT TCA TGT TTA CCA ATA AGT TTA AGG CGC GGG TGA TGG TGT CGC GCT
TGC CTA CTA AGG ACA ATC AGG TGG AGC TGA AAT ACG AGT GGG TGG AGT TCA
CGC TGC CCG AGG GCA ACT ACT CCG AGA CCA TGA CCA TAG ACC TTA TGA ACA
ACG CGA TCG TGG AGC ACT ACT TGA AAG TGG GCA GAC AGA ACG GGG TTC TGG
AAT GCG ACA TCG GGG TAA AGT TTG ACA CCC GCA ACT TCA GAC TGG GGT TTG
ATC CCG TCA CTG GTC TTG TCA TGN CTG GGG TAT ATA CAA ACG AAG CCT TCC
ATC CAG ACA TCA TTT TGC TGC CAG GAT GCG GGG TGG ACT TCA CCC ACA GCC
GCC TGA GCA ACT TGN TGG GCA TCC GCA TGC GGC AAN CNT TNC NGG AGG GCT
TTA GGA TCA CCN ACG ATG ATC TGN AGG (SEQ ID NO: 13)

```

Mutaciones

La supresión en la base 340 (232 ts) provoca un desplazamiento de fase de lectura

La secuencia de aminoácidos de ts es: ...Thr-Asp-Val-Ala-Ser-Leu...

La secuencia mutada es: ...Thr-Val-Trp-His-Pro-Parada

Secuencia de aminoácidos prevista:

5'3' Fase de lectura 1

G S Met R R A A Met Y E E G P P P S Y E S V V S A A P V A A A L G S P F D A P L D P P F V
P P R Y L R P T G G R N S I R Y S E L A P L F D T T R V Y L V D N K S T V W H P Parada (SEQ
ID NO: 14)

Codifica 81 aminoácidos

Figura 15

Secuencia de ácido nucleico:

TTTACTTTAAGAAGGAGANATACAT

```

ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT NAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT
GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG
GCA TCA ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA GGT CCT CCT CCC TCC TAC
GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC
GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG TTT GTG CCT CCG CGG TAC CTG CGG CCT ACC
GGG GGG AGA AAC AGC ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC
ACC CGT GTG TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GTG TGG CAT CCC TGA ACT
ACC AGA ACG ACC ACA GCA ACT TTC TGA CCA CGG TCA TTC AAA ACA GTG ACT
ACA GCC CGG GGG AGG CAA GCA CAC AGA CCA TCA ATC TTG ACG ACC GGT CGC
ACT GGG GCG GCG ACC TGA AAA CCA TCC TGC ATA CCA ACA TGC CAA ATG TGA
ACG AGT TCA TGT TTA CCA ATA AGT TTA AGG CGC GGG TGA TGG TGT CGC GCT
TGC CTA CTA AGG ACA ATC AGG TGG AGC TGA AAT ACG AGT GGG TGG AGT TCA
CGC TGC CCG AGG GCA ACT ACT CCG AGA CCA TGA CCA TAG ACC TTA TGA ACA
ACG CGA TCG TGG AGC ACT ACT TGA AAG TGG GCA GAC AGA ACG GGG TTC TGG
AAT GCG ACA TCG GGG TAA AGT TTG ACA CCC GCA ACT TCA GAC TGG GGT TTG
ATC CCG TCA CTG GTC TTG TCA TGC CTG GGG TAT ATA CAA ACG AAG CCT TCC
ATC CAG ACA TCA TTT TGC TGC CAG GAT GCG GGG TGG ACT TCA CCC ACA GCC
GCC TGA GCA ACT TGT TGG GCA TCC GCA TGC GGC AAC CCT TNC AGG AGG GCT
TTA GGA TCA CCT ACG ATG ATC TGN AGG GNN GNA NCA TTN CCC GCA CTG NTG
GAN GT (SEQ ID NO: 15)

```

La supresión en la base 340 (232 ts) provoca un desplazamiento de fase de lectura

Secuencia de aminoácidos prevista:

MRRAAMYEEG PPPSYESVVS AAPVAAALGS PFDAPLDPPFVPPRYLRPTG
GRNSIRYSELAPLFDTTTRVY LVDNKSTVWHP (SEQ ID NO: 16)

Número de aminoácidos: 81

Peso molecular: 8918,1

pI teórico: 6,54

Figura 16

Secuencia de ácido nucleico:

ATTTTGTTTACTTTAAGAAGGAGATATACAT

```

ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT
GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG
CGA TCG ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA GGT CCT CCT CCC TCC TAC
GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC
GAT GCT CCC CTG GAC CCG CCG TTT GTG CCT CCG CGG TAC CTG CGG CCT ACC
GGG GGG AGA AAC AGC ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC
ACC CGT GTG TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GAT GTG GCA TCC CTG AAC
TAC CAG AAC GAC CAC AGC AAC TTT CTG ACC ACG GTC ATT CAA AAC AAT GAC
TAC AGC CCG GGG GAG GCA AGC ACA CAG ACC ATC AAT CTT GAC GAC CGG TCG
CAC TGG GGC GGC GAC CTG AAA ACC ATC CTG CAT ACC AAC ATG CCA AAT GTG
AAC GAG TTC ATG TTT ACC AAT AAG TTT AAG GCG CGG GTG ATG GTG TCG CGC
TTG CCT ACT AAG GAC AAT CAG GTG GAG CTG AAA TAC GAG TAG GTG GAG TTC
ACG CTG CCC GAG GGC AAC TAC TCC GAG ACC ATG ACC ATA GAC CTT ATG AAC
AAC GCG ATC GTG GAG CAC TAC TTG AAA GTG GGC AGA CAG AAC GGG GTT CTG
GAA AGC GAC ATC GGG GTA AAG TTT GAC ACC CGC AAC TTC AGA CTG GGG TTT
GAC CCC GTC ACT GGT CTT GTC ATG CCT GGG GTA TAT ACA AAC GAA GCC TNN
CAT CCA GAC ATC ATT TTG CTG CCA GGA TGC GGG GTG GAC TTC ACC CAC AGC
CGC CTG AGC AAC TTG TTG GGC ATC CNC AAG CGG CAA CCC TTN CAG G (SEQ
ID NO: 17)

```

Mutaciones

Base 602 (494 ts) G > A Glutamina > Parada. Misma mutación que 3311

Secuencia de aminoácidos prevista:

MRRAAMYEEGPPPSYESVVSAAAPVAAAALGSPFDAPLDPPFVPPRYLRPTGGRNSIRYSELAPL
 FDTTRVYLVDNKSTDVASLNYQNDHSNFLTTVIQNNDYSPGEASTQTINLDDRSHWGGDLK
 TILHTNMPNVNEFMFTNKFKARVMVSRPDKDNQVELKYE (SEQ ID NO: 18)

Número de aminoácidos: 164

Peso molecular: 18400,5

pI teórico: 5,58

Figura 17

Secuencia de ácido nucleico:

Secuencia ensamblada a partir de los datos 5' y 3' de Bradley Reinfeld

```

ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT
GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG
CTG TGG ATG CGG CGC GCG GCG ATG TAT GAG GAA GGT CCT CCT CCC TCC TAC
GAG AGT GTG GTG AGC GCG GCG CCA GTG GCG GCG GCG CTG GGT TCT CCC TTC
GAT GCT CCC CTG GAC CCA CCG TTT GTG CCT CCG CGG TAC CTG CGG CCT ACC
GGG GGG AGA AAC AGC ATC CGT TAC TCT GAG TTG GCA CCC CTA TTC GAC ACC
ACC CGT GTG TAC CTG GTG GAC AAC AAG TCA ACG GAT GTG GCA TCC CTG AAC
TAC CAG AAC GAC CAC AGC AAC TTT CTG ACC ACG GTC ATT CAA AAC AAT GAC
TAC AGC CCG GGG GAG GCA AGC ACA CAG ACC ATC AAT CTT GAC GAC CGG TCG
CAC TGG GGC GGC GAC CTG AAA ACC ATC CTG CAT ACC AAC ATG CCA AAT GTG
AAC GAG TTC ATG TTT ACC AAT AAG TTT AAG GCG CGG GTG ATG GTG TCG CGC
TTG CCT ACT AAG GAC AAT CAG GTG GAG CTG AAA TAC GAG TGG GTG GAG TTN
ACG CTG CCC GAG GGC AAC TAC TCC GAG ACC ATG ACC ATA GAC CTT ATG AAC
AAC GCG ATC GTG GAG CAC TAC TTG AAA GTG GGC AGA CAG AAC GGG GTT CTG
GAA AGC GAC ATC GGG GTA AAG TTT GAC ACC CGC AAC TTC AGA CTG GGG TTT
GAC CCC GTC ACT GGT CTT GTC ATG CCT GGG GTA TAT ACA AAC GAA GCC TTC
CAT CCA GAC ATC ATT TTG CTG CCA GGA TGC GGG GTG GAC TTC ACC CAC AGC
CGC CTG AGC AAC TTG TTG GGC ATC CGC AAG CGG CAA CCC TTC CAG GAG GGC
TTT AGG ATC ACC TAC GAT GAT CTG GAG GGT GGT AAC ATT CCC GCA CTG TTG
GAT GTG GAC GCN TAC CAG GCG AGC TTG AAA GAT GAC ACC GAA CAG GGC GGG
GGT GGC GCA GGC GGC AGC AAC AGC AGT GGC AGC GGC GCG GAA GAG AAC TCC
AAC GCG GCA GCC GCG GCA ATG CAG CCG GTG GAG GAC ATG AAC GAT CAT GCC
ATT CGC GGC GAC ACC TTT GCC ACA CGG GCT GAG GAG AAG CGC GCT GAG GCC
GAA GCA GCG GCC GAA GCT GCC GCC CCC GCT GCG CAA CCC GAG GTC GAG AAG
CCT CAG GAG AAA CCG GTG ATC AAA CCC CTG ACA GAG GAC AGC AAG AAA CGC
AGT TAC AAC CTA ATA AGC AAT GAC AGC ACC TTC ACC CAG TAC CGC AGC TGG
TAC CTT GCA TAC AAC TAC GGC GAC CCT CAG ACC GGA ATC CGC TCA TGG ACC
CTG CTT TGC ACT CCT GAC GTA ACC TGC GGC TCG GAG CAG GTC TAC TGG TCG
TTG CCA GAC ATG ATG CAA GAC CCC ATG ACC TTC CGC TCC ACG CGC CAG ATC
AGC AAC TTT CCG GTG GTT GGC GCC GAG CTG TTG TCC GTG CAC TCC AAG AGC
TTC TAC AAC GAC CAG GCC GTC TAC TCC CAA CTC ATC CGC CAG TTT ACC TCT
CTG ACC CAC GTG TTC AAT CGC TTT CCC GAG AAC CAG ATT TTG GCG CGC CCG
CCA GCC CCC ACC ATC ACC ACC GTC AGT GAA AAC GTT CCT GCT CTC ACA GAT
CAC GGG ACG CTA CCG CTG CGC AAC AGC ATC GGA GGA GTC CAG CGA GTG ACC
ATT ACT GAC GCC AGA CGC CGC ACC TGC CCC TAC GTT TAC AAG GCC CTG GGC
ATA GTC TCG CCG CGC GTC CTA TCG AGC CGC ACT TTT TGA GAA TTC GAA GCT
TGA TCC GGC TGC TAA CAA AGC CCG AAA GGA AGC NGA GTN GGC TGC TGC CAC
C (SEQ ID NO: 19)

```

Figura 17 (continuación)

Secuencia de aminoácidos prevista:

MRRAAMYEEGPPPSYESVVSAAAPVAAALGSPFDAPLDPPFVPPRYLRPTGGRNSIRYSEL
 APLFDTTTRVYLVDNKSTDVASLNYQNDHSNFLTTVIQNNDYSPGEASTQTINLDDRSHWGGD
 LKTILHTNMPNVNEFMFTNKFKARVMVSRLPTKDNQVELKYEWVEXTLPEGNYSETMTIDL
 MNNAIVEHYLKVGRQNGVLESDIGVKFDTRNFRLGFDPVTGLVMPGVYTNEAFHPDIILLPG
 CGVDFTHSRLSNLLGIRKRQPFQEGFRITYDDLEGGNIPAL  DXYQASLKDDTEQGGGGA
 GGSNSSGSGAEENSNAAAAAAMQPVEDMNDHAI  TFATRAEEKRAEAEAAAEAAAPAAQ
 PEVEKPQEKPVIKPLTEDSKKRSYNLISNDSTFTQYRSWYLAYNYGDPQTGIRSWTLLCTPDV
 TCGSEQVYWSLPDMMQDPMFTRSTRQISNFPVVGAELLSVHSKSFYNDQAVYSQLIRQFTSLT
 HVFNRFPENQILARPPAPTITTVSENVPALTDHGTLPLRNSIGGVQQRVTITDARRRTCYPVYKAL
 GIVSPRVLSSRTF (SEQ ID NO: 20)

Número de aminoácidos: 571

Peso molecular: 63320,2

pI teórico: 5,25