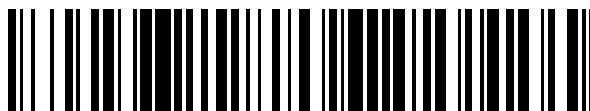


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 565**

51 Int. Cl.:

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/US2014/029699**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14145050**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14727652 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018** **EP 2970921**

54 Título: **Conjugados de Fc-histidil-ARNt sintetasa**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361789011 P

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

10.04.2019

73 Titular/es:

ATYR PHARMA, INC. (100.0%)
3545 John Hopkins Court, Suite 250
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

BUECHLER, YING;
CHIANG, KYLE;
DO, MINH-HA;
LEE, DARIN;
PIEHL, KRISTI;
THOMAS, MARC;
WATKINS, JEFFRY D;
WU, CHI-FANG y
MENDLEIN, JOHN D.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 708 565 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

Conjugados de Fc-histidil-ARNt sintetasa

5 ANTECEDENTES

Campo técnico

La presente descripción se refiere, en general, a conjugados, tales como polipéptidos de fusión, de uno o más polipéptidos de histidil-ARNt sintetasa (HRS) y regiones Fc de inmunoglobulina, composiciones que los comprenden y procedimientos de uso de dichos polipéptidos y composiciones para tratar o diagnosticar diversas afecciones.

Descripción de la técnica relacionada

15 Las fisiocrinas son dominios de proteínas de origen natural generalmente pequeños que se encuentran en la familia de genes de aminoacil-ARNt sintetasa (AARS) de organismos superiores, que no son necesarios para el papel bien establecido de las aminoacil-ARNt sintetasa en la síntesis de proteínas. Hasta que se descubrió el paradigma fisiocrino, las aminoacil-ARNt sintetasa, una familia de aproximadamente 20 enzimas, eran conocidas solo por su expresión ubicua en todas las células vivas, y su papel esencial en el proceso de síntesis de proteínas. Sin embargo, 20 hallazgos científicos más recientes sugieren ahora que las aminoacil-ARNt sintetasa poseen funciones adicionales más allá de la síntesis de proteínas y, de hecho, han evolucionado en organismos multicelulares para desempeñar importantes papeles homeostáticos en la fisiología y las enfermedades de los tejidos.

Los indicios de la existencia de la función no canónica de las AARS incluye comparaciones de secuencias bien 25 definidas que establecen que, durante la evolución de organismos unicelulares simples a formas de vida más complejas, las AARS han evolucionado para ser más estructuralmente complejas a través de la adición de dominios adjuntos, sin perder la capacidad de facilitar la síntesis de proteínas.

De forma coherente con esta hipótesis, se ha descubierto un conjunto rico y diverso de funciones expandidas para 30 las AARS en eucariotas superiores, y en particular para ARNt sintetasa humanas. Estos datos, que se basan tanto en el análisis directo de los dominios individuales como en el descubrimiento de mutaciones en los genes de las ARNt sintetasa que están vinculadas causalmente a la enfermedad, pero que no afectan la actividad de aminoacilación o de síntesis de proteínas, sugieren que estos dominios recién adjuntados o fisiocrinas son fundamentales para las funciones no canónicas recién adquiridas de las AARS.

35 Adicionalmente, existe un creciente reconocimiento de que las ARNt sintetasa específicas, tales como la histidil-ARNt sintetasa (HRS), pueden ser liberadas o secretadas por las células vivas y pueden proporcionar importantes señales de acción local con propiedades inmunomoduladoras, quimiotácticas y angiogénicas. La confirmación directa del papel de las AARS como moléculas de señalización extracelular se ha obtenido a través de estudios que 40 muestran la secreción y la liberación extracelular de ARNt sintetasa específicas, así como la demostración directa de que la adición de fragmentos de las ARNt sintetasa que comprenden los dominios recién adjuntados (fisiocrinas), pero no otros fragmentos que carecen de estos dominios, están activos en una gama de vías de señalización extracelular. Estas fisiocrinas, tales como la HRS, representan una oportunidad nueva y sin explotar previamente para desarrollar nuevas proteínas terapéuticas de primera clase para tratar enfermedades humanas.

45 Para explotar de la mejor manera estas y otras actividades en entornos terapéuticos o de diagnóstico, existe una necesidad en la técnica de polipéptidos de HRS que tengan propiedades farmacocinéticas mejoradas. Estas formas terapéuticas mejoradas de los polipéptidos de HRS permiten el desarrollo de regímenes terapéuticos más eficaces para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos, y requieren una administración significativamente menos 50 frecuente que las proteínas no modificadas.

El documento WO 2010/107825 se refiere a variantes de *splicing* de histidil-ARNt sintetasa que pueden conjugarse con un enlazador u otra secuencia, tal como una región Fc de inmunoglobulina.

55 El documento WO 2011/072265 se refiere a histidil-ARNt sintetasa para tratar la inflamación y que pueden fusionarse con una región Fc para mejorar las características deseadas, tales como el aumento de la semivida en circulación y la mejora del direccionamiento *in vivo*.

El documento WO2013/123432 se refiere a polipéptidos de histidil-ARNt sintetasa que pueden fusionarse con 60 dominios Fc de anticuerpos y usarse para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

El documento US 2014/066321 se refiere a polipéptidos variantes de histidil-ARNt sintetasa que pueden fusionarse a regiones Fc y que pueden ser útiles para la terapia y el descubrimiento de fármacos.

- 5 El documento Carter y col. Experimental cell research, academic press 2011, 1261-1269 divulga la técnica de fusión de proteínas y péptidos a un dominio Fc de una inmunoglobulina con el fin de mejorar sus propiedades farmacocinéticas y biológicas.

El documento Huang y col. Current opinion in biotechnology 2009, 692-699 se refiere a la terapéutica de fusión de receptor-Fc y divulga los diferentes enfoques para diseñar proteínas de fusión Fc.

El documento Haussermann y col. Pneumologie 2010, 496-503 divulga la relación de histidil-ARNt con ciertas enfermedades tales como una forma específica de miositis con enfermedad pulmonar intersticial.

- 15 El documento Levine y col. Current opinion in rheumatology 2003, 708-713 se refiere a respuestas inmunitarias anti-aminoacil ARNt sintetasa y divulga los enlaces entre las moléculas de ARS, la inflamación y la apoptosis.

El documento US 2011/086058 se refiere a composiciones inmunógenas para prevenir la infección con virus de la gripe y divulga las composiciones inmunógenas tales como hemaglutinina de un virus de la gripe y un inmunopotenciador tal como un fragmento Fc de IgG humana.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 ilustra la composición estructural de una inmunoglobulina ejemplar, y proporciona una visión general de las clases y subclases de anticuerpos.

La figura 2 muestra un alineamiento de las regiones Fc de IgA1 (SEQ ID NO:156), IgA2 (SEQ ID NO:157), IgM (SEQ ID NO:158), IgG1 (SEQ ID NO:159), IgG2 (SEQ ID NO:160), IgG3 (SEQ ID NO:161), IgG4 (SEQ ID NO:162) e IgE (SEQ ID NO:163) humanas. La estructura secundaria de Fc α se muestra por encima de las secuencias. Los signos de intercalación (^) y los asteriscos (*) muestran residuos que contribuyen respectivamente al 0-4 % y al 5-12 % de la superficie de unión.

La figura 3 muestra los resultados del análisis SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras de HRS de longitud completa y HRS(1-506). Los resultados muestran que HRS(1-506) reduce drásticamente la formación de la formación de enlaces entre cadenas mediada por disulfuro en comparación con la proteína de longitud completa. Las muestras (10 μ g) se cargaron en un gel Bis-Tris al 4-12 %, utilizando un tampón de desplazamiento MOPS-SDS.

La figura 4 muestra las propiedades antiinflamatorias de un polipéptido derivado de HRS ejemplar en un modelo de colitis en ratón inducida por TNBS. Los estudios se realizaron en ratones BDF-1 macho, con 12 ratones/grupo. Se añadieron TNBS y budesonida a 5 mg/kg al agua. La HRS(1-60) (Resokine, (HisRS^{N4})) se administró diariamente mediante inyección IV, comenzando 3 días antes del tratamiento con TNBS, a una concentración de 1 o 5 mg/kg. Esta figura muestra el porcentaje (%) de supervivencia de ratones tratados y no tratados durante aproximadamente 80 horas.

La figura 5A muestra el régimen de dosificación usado para evaluar la utilidad terapéutica de HRS (1-506) en el modelo de miopatía de estatina. Los grupos de dosificación de tratamiento incluyeron vehículo (n = 11), 0,3 mg/kg HRS(1-506) (n = 8), 1,0 mg/kg HRS(1-506) (n = 8), 3,0 mg/kg HRS(1-506) (n = 8); La figura 5B muestra los resultados de las mediciones de troponina C después de 15 días de tratamiento con estatinas +/- HRS(1-506) a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg. La figura muestra el efecto positivo de HRS (1-506) en la reducción de la inducción de troponina C inducida por estatinas.

La figura 6A muestra los resultados de las mediciones de CK después de 12 días de tratamiento con estatinas +/- HRS(1-506) a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg; La figura 6B muestra los mismos datos después de 15 días de tratamiento. La figura muestra el efecto positivo de HRS(1-506) en la reducción de los niveles de CK inducidos por estatinas.

La figura 7 muestra los niveles de HARS circulante después de 15 días de tratamiento con estatinas en comparación con el control con vehículo. La figura muestra que las estatinas inducen la liberación de HARS extracelular.

La figura 8 muestra imágenes representativas de H&E de secciones de isquiotibiales a 10 aumentos después de 15

días de tratamiento con estatinas +/- HRS(1-506) a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg.

La figura 9 muestra los resultados del perfil de expresión génica de isquiotibiales de ratas tratadas con estatina. Los datos muestran cambios en la expresión de 137 genes seleccionados para rastrear los marcadores musculares y la función de las células inmunitarias, la inflamación, el estado metabólico, la recuperación de tejidos, el crecimiento y la atrofia musculares. Los valores de expresión génica se normalizaron respecto a genes de referencia y se representaron como cambio de veces frente al grupo tratado con vehículo.

La figura 10A muestra los resultados del perfil de expresión génica de isquiotibiales de ratas tratadas con estatina. Los datos muestran cambios en la expresión de 137 genes (como en la figura 7) para comparar los cambios relativos en la expresión génica de animales tratados con estatina en comparación con animales tratados con vehículo. **La figura 10B** muestra los cambios relativos en la expresión génica de los animales tratados con estatina que también se trataron con HRS(1-506) en comparación con los animales tratados con estatina sola.

La figura 11 muestra los resultados del perfil de expresión génica de isquiotibiales de ratas tratadas con estatina de 10 genes relacionados con diabetes/síndrome metabólico después de 15 días de tratamiento con estatinas +/- HRS(1-506) a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg.

La figura 12 muestra los resultados del perfil de expresión génica de isquiotibiales de ratas tratadas con estatina de 26 genes marcadores de células inmunitarias después de 15 días de tratamiento con estatinas +/- HRS(1-506) a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg.

Las figuras 13A-D muestran los resultados del perfil de expresión génica de los genes CD11a, CD11b, CD8a y CD8b en isquiotibiales de ratas tratadas con estatina después de 15 días de tratamiento con estatinas +/- HRS(1-506) a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg.

Las figuras 14A-C muestran los resultados del perfil de expresión génica de los genes CD18, CCR5 y CD45R en isquiotibiales de ratas tratadas con estatina después de 15 días de tratamiento con estatinas +/- HRS(1-506) a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg.

La figura 15 muestra los resultados del perfil de expresión génica de 17 genes marcadores inflamatorios en isquiotibiales de ratas tratadas con estatina después de 15 días de tratamiento con estatinas +/- HRS(1-506) a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg.

Las figuras 16A-D muestran los resultados del perfil de expresión génica de las citocinas inflamatorias IL-6, MCP1, IL-10 e interferón-gamma (IFN- γ) en isquiotibiales de ratas tratadas con estatina después de 15 días de tratamiento con estatinas +/- HRS(1-506) a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg.

La figura 17 muestra los resultados del perfil de expresión génica de isquiotibiales de ratas tratadas con estatina de 14 genes relacionados con la adhesión, el desarrollo y la fibrosis después de 15 días de tratamiento con estatinas +/- HRS(1-506) a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg.

La figura 18 muestra los resultados del perfil de expresión génica de isquiotibiales de ratas tratadas con estatina de 14 genes relacionados con atrofia/atrofia progresiva musculares después de 15 días de tratamiento con estatinas +/- HRS(1-506) a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg.

La figura 19A muestra los resultados del perfil de expresión génica de isquiotibiales de ratas tratadas con estatina de 14 genes relacionados con atrofia/atrofia progresiva musculares después de 15 días de tratamiento con estatinas +/- HRS(1-506) a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg. **La figura 19B** muestra cambios específicos en MMP-3, y **la figura 19C** muestra cambios específicos en la expresión del gen MMP-9 en las mismas condiciones.

La figura 20 muestra los resultados del perfil de expresión génica de isquiotibiales de ratas tratadas con estatina de 29 genes relacionados con la miogénesis después de 15 días de tratamiento con estatinas +/- HRS(1-506) a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg.

La figura 21 muestra los resultados del análisis SDS-PAGE de proteínas de fusión Fc purificadas. Carril 1: véase escalera de proteínas Blue Plus2 (Life Technologies). Carriles 2 y 6: Fc-HRS (2-60) n.º de lote 472. Carriles 3 y 7: HRS (1-60)-Fc n.º de lote 473. Carriles 4 y 8: Fc-HRS (2-60) n.º de lote 480. Carriles 5 y 9: HRS (1-60)-Fc n.º de lote 482. Los carriles 2-5 se desplazaron en condiciones no reducidas, y los carriles 6-9 en condiciones reducidas.

La figura 22. Muestra un análisis analítico por HPLC de exclusión por tamaño de la fusión Fc-HRS (2-60) representativa purificada después de cromatografía con proteína A, de intercambio catiónico y con hidroxipatita (superposición de inyecciones duplicadas). La pureza es el 99,2 % del pico principal y el 0,8 % de especies de alto peso molecular (HMW).

La figura 23A muestra el tiempo frente a la concentración de HRS(1-60) después de inyección intravenosa o subcutánea a ratones. **La figura 23B** muestra el tiempo frente a la concentración de Fc-HRS(2-60) y HRS(1-60)-Fc después de inyección intravenosa a ratones. **La figura 23C** muestra el tiempo frente a la concentración de Fc-HRS(2-60) y HRS(1-60)-Fc después de inyección subcutánea a ratones.

La figura 24A muestra las puntuaciones del índice de actividad de la enfermedad (DAI) en el sacrificio en ratones tratados con diferentes proteínas de fusión HRS-Fc. Las barras representan la media de DAI ($\pm$ SEM) para cada grupo de tratamiento. El DAI incorpora información sobre el sangrado y la diarrea junto con una puntuación para la pérdida de peso. **La figura 24B** muestra la relación peso:longitud del colon en el sacrificio en ratones tratados con compuestos. Las barras representan la relación media ($\pm$ SEM) para cada grupo de tratamiento.

La figura 25 muestra una visión general de los cambios transcripcionales en el estudio con TNBS. Se muestran cambios transcripcionales relativos en animales tratados con TNBS (grupo 2), animales tratados con TNBS y budesonida (grupo 3), TNBS y artículo de prueba A (HRS(1-60); grupo 4) y TNBS y artículo de prueba B (Fc-HRS(2-60); grupos 5 y 6) después de la normalización respecto a animales sin tratamiento previo (grupo 1). Cada punto en el diagrama de dispersión representa un gen medido. 7 genes en el grupo 2 fueron regulados positivamente más de 10 veces (IL6, IL1b, MCP-1, MMP3, MMP9, CD11b e IL10).

Las figuras 26A-26H muestran los genes relacionados con respuestas inmunitaria e inflamatoria regulados positivamente por TNBS. Se muestran cambios transcripcionales relativos de genes individuales en animales tratados con TNBS (grupo 2), animales tratados con TNBS y budesonida (grupo 3), TNBS y artículo de prueba A (HRS(1-60); grupo 4) y TNBS y artículo de prueba B (Fc-HRS(2-60); grupos 5 y 6) después de la normalización respecto a animales sin tratamiento previo (grupo 1). Cada punto en el diagrama de dispersión representa la abundancia del gen de interés en cada animal dentro del grupo. La significación se calculó usando la prueba de la t de Student, donde * = valor $p < 0,05$ y ** = valor $p < 0,01$.

Las figuras 27A-27D muestran los porcentajes relativos de diferentes poblaciones de linfocitos T en los bazo de ratones sin tratamiento previo o ratones tratados por vía intracolónica con TNBS para inducir colitis experimental, tratados con TNBS $\pm$ 0,5 mg/kg de Fc-HRS (2-60). Se muestra el porcentaje de linfocitos vivos teñidos para (27A) CD3, (27B) CD8, (27C) CD4 y (27D) CD25 y FoxP3. Los linfocitos Treg se acotaron adicionalmente en linfocitos CD4⁺.

BREVE RESUMEN

Las realizaciones de la presente descripción se refieren, en general, a conjugados polipeptídicos de histidil-ARNt sintetasa (HRS) que tienen una o más regiones Fc de inmunoglobulina unidas covalentemente a los mismos, composiciones farmacéuticas que comprenden dichas moléculas, procedimientos de fabricación y procedimientos para su uso terapéutico. Entre otras ventajas, los conjugados HRS-Fc de la presente descripción pueden poseer propiedades farmacocinéticas mejoradas y/o actividades biológicas terapéuticamente relevantes mejoradas, con respecto a los polipéptidos de HRS no modificados correspondientes.

Ciertas realizaciones de la presente descripción incluyen, por lo tanto, polipéptidos de fusión HRS, que comprenden un polipéptido de HRS que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 80 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO:1-106, 170-181 o 185-191 o una secuencia de cualquiera de las **tablas D1, D3-D6 o D8**, y al menos una región Fc fusionada con el extremo C, el extremo N o ambos, del polipéptido de HRS. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntico a cualquiera de las SEQ ID NO:1-106, 170-181 o 185-191 o una secuencia de cualquiera de las **tablas D1, D3-D6 o D8**. En realizaciones particulares de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:1-106, 170-181 o 185-191 o una secuencia de cualquiera de las **tablas D1, D3-D6 o D8**.

En realizaciones particulares de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende los residuos de aminoácidos 2-40, 2-45, 2-50, 2-55, 2-60, 2-66 o 1-506 de la SEQ ID NO:1, o una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a los residuos 2-40, 2-45, 2-50, 2-55, 2-60, 2-66 o 1-506 de la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una longitud de aproximadamente 40-80

aminoácidos y comprende los residuos 2-45 de la SEQ ID NO:1. En realizaciones específicas de la presente descripción, el polipéptido de HRS consiste o consiste esencialmente en los residuos de aminoácidos 2-40, 2-45, 2-50, 2-55, 2-60, 2-66 o 1-506 de la SEQ ID NO:1.

- 5 En algunas realizaciones de la presente descripción, al menos un residuo de cisteína endógeno del polipéptido de HRS se ha sustituido con otro aminoácido o se ha eliminado. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el al menos un residuo de cisteína endógeno se selecciona de entre Cys174, Cys191, Cys224, Cys235, Cys507 y Cys509. En realizaciones particulares de la presente descripción, el al menos un residuo de cisteína endógeno se selecciona de entre Cys224, Cys235, Cys507 y Cys509. En realizaciones específicas de la presente descripción, los
10 residuos de cisteína endógenos son Cys507 y Cys509. En algunas realizaciones de la presente descripción, todos los residuos de cisteína expuestos en la superficie endógenos se han sustituido con otro aminoácido o se han eliminado.

- En ciertas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS se repite en tándem. En realizaciones
15 particulares de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende un dominio WHEP. En realizaciones específicas de la presente descripción, el polipéptido de HRS carece de un dominio de aminoacilación funcional. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS consiste esencialmente en un dominio WHEP. En aspectos específicos de la presente descripción, el dominio WHEP de un polipéptido de HRS o variante o fragmento del mismo tiene la secuencia de consenso en la **tabla D5**.

- 20 En algunas realizaciones de la presente descripción, la región Fc y el polipéptido de HRS están separados por un enlazador peptídico. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el enlazador peptídico tiene aproximadamente 1-200 aminoácidos, 1-150 aminoácidos, 1-100 aminoácidos, 1-90 aminoácidos, 1-80 aminoácidos, 1-70 aminoácidos, 1-60 aminoácidos, 1-50 aminoácidos, 1-40 aminoácidos, 1-30 aminoácidos, 1-
25 10 aminoácidos o 1-5 aminoácidos de longitud. En realizaciones particulares de la presente descripción, el enlazador peptídico tiene aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos de longitud. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el enlazador peptídico consiste en residuos de Gly y/o Ser. En algunas realizaciones de la presente descripción, el enlazador peptídico es un enlazador
30 fisiológicamente estable. En otras realizaciones de la presente descripción, el enlazador peptídico es un enlazador liberable, opcionalmente un enlazador escindible enzimáticamente. En realizaciones específicas de la presente descripción, el enlazador peptídico comprende una secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO:200-260, u otro enlazador peptídico descrito en el presente documento.

- 35 En algunas realizaciones de la presente descripción, la región Fc se fusiona con el extremo C del polipéptido de HRS. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la región Fc se fusiona con el extremo N del polipéptido de HRS.

- En ciertas realizaciones de la presente descripción, la región Fc comprende uno o más de un dominio bisagra, CH₂,
40 CH₃ y/o CH₄ de una IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y/o IgM de mamífero. En algunas realizaciones de la presente descripción, la región Fc comprende los dominios bisagra, CH₂ y CH₃ de IgG1. En algunas realizaciones de la presente descripción, la región Fc comprende los dominios bisagra, CH₂ y CH₃ de IgG2. En algunas realizaciones de la presente descripción, la región Fc comprende los dominios bisagra, CH₂ y CH₃ de IgG3. En realizaciones particulares de la presente descripción, el polipéptido de fusión HRS no comprende las regiones CH₁,
45 CL, VL y VH de una inmunoglobulina.

- En realizaciones específicas de la presente descripción, la región Fc comprende una cualquiera de las SEQ ID NOS:128-163 o 339-342, o una variante, o un fragmento, o una combinación de los mismos. En ciertas
50 realizaciones de la presente descripción, el dominio bisagra es un dominio bisagra de IgG1 modificado que comprende la SEQ ID NO:341.

- En realizaciones particulares de la presente descripción, la región Fc comprende una secuencia de aminoácidos al
menos el 90 % idéntica a
MSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
55 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:339)
o
SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
60 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:340).

En ciertas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de fusión HRS-Fc comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a Fc-HRS(2-60) (SEQ ID NO:337), o HRS(1-60)-Fc (SEQ ID NO:338), o Fc-HRS(2-40) (SEQ ID NO:381), o HRS(1-40)-Fc (SEQ ID NO:386), o Fc-HRS(2-45) (SEQ ID NO:382), o HRS(1-45)-Fc (SEQ ID NO:387), o Fc-HRS(2-50) (SEQ ID NO:383), o HRS(1-50)-Fc (SEQ ID NO:388), o Fc-HRS(2-55) (SEQ ID NO:384), o HRS(1-55)-Fc (SEQ ID NO:389), o Fc-HRS(2-66) (SEQ ID NO:385), o HRS(1-66)-Fc (SEQ ID NO:390), o Fc-HRS(2-60) HRS(2-60) (SEQ ID NO:396).

10 En ciertos aspectos, el polipéptido de fusión HRS tiene farmacocinética alterada con respecto a un polipéptido de HRS correspondiente. Los ejemplos de dicha farmacocinética alterada incluyen una mayor semivida en suero, mayor biodisponibilidad, mayor exposición y/o disminución del aclaramiento. En ciertos aspectos, la exposición aumenta en al menos 100 veces. En algunos aspectos, el polipéptido de fusión HRS tiene una semivida de al menos 30 horas en ratones. En ciertos aspectos, la biodisponibilidad es una biodisponibilidad subcutánea que aumenta en al menos
15 aproximadamente un 30 %. En algunos aspectos, el polipéptido de fusión HRS tiene una actividad efectora inmunitaria alterada en relación con un polipéptido de HRS correspondiente. Los ejemplos de dichas actividades efectoras inmunitarias incluyen una o más de activación del complemento, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP).

20 En ciertas realizaciones de la presente descripción, la región Fc comprende una región Fc variante, con respecto a una región Fc de tipo silvestre. En algunas realizaciones de la presente descripción, la región Fc variante comprende una secuencia que es al menos el 90 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO:128-163 o 341, o una combinación de dichas secuencias. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la región Fc variante comprende un
25 híbrido de una o más regiones Fc de diferentes especies, diferentes clases de Ig o diferentes subclases de Ig. En realizaciones particulares de la presente descripción, la región Fc variante comprende un híbrido de uno o más dominios bisagra, CH₂, CH₃ y/o CH₄ de regiones Fc de diferentes especies, diferentes clases de Ig y/o diferentes subclases de Ig.

30 En ciertas realizaciones de la presente descripción, la región Fc variante es una glucoforma modificada, con respecto a una región Fc de tipo silvestre correspondiente. En realizaciones particulares de la presente descripción, la región Fc variante tiene una farmacocinética alterada con respecto a una región Fc de tipo silvestre correspondiente. Los ejemplos de dicha farmacocinética alterada incluyen semivida en suero, biodisponibilidad y/o aclaramiento. En algunas realizaciones de la presente descripción, la región Fc variante tiene una actividad efectora
35 alterada con respecto a una región Fc de tipo silvestre correspondiente. Los ejemplos de dichas actividades efectoras incluyen una o más de activación del complemento, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), o fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP).

40 En ciertas realizaciones de la presente descripción, la región Fc variante tiene una unión alterada a uno o más receptores de Fc γ , con respecto a una región Fc de tipo silvestre correspondiente. Los receptores de Fc γ ejemplares se describen en el presente documento y se conocen en la técnica.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, la región Fc variante tiene unión alterada a uno o más receptores
45 FcRn, con respecto a una región Fc de tipo silvestre correspondiente. Los receptores FcRn ejemplares se describen en el presente documento y se conocen en la técnica.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la región Fc variante tiene solubilidad alterada (por ejemplo, aumentada), con respecto a una región Fc de tipo silvestre correspondiente, y el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene
50 solubilidad alterada, con respecto a un polipéptido de HRS no modificado correspondiente.

En realizaciones específicas de la presente descripción, el polipéptido de fusión HRS-Fc está sustancialmente en forma dimérica en una solución fisiológica, o en otras condiciones fisiológicas, tales como condiciones *in vivo*. En realizaciones específicas de la presente descripción, el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene sustancialmente la misma
55 estructura secundaria que un polipéptido de HRS no modificado o modificado de forma diferente correspondiente, de acuerdo con se determina mediante un análisis de dicroísmo circular UV.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene un perfil de AUC farmacocinético en plasma o suero al menos 5 veces mayor que un polipéptido de HRS no modificado
60 correspondiente cuando se administra a un mamífero.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene sustancialmente la misma actividad que un polipéptido de HRS no modificado o modificado de forma diferente correspondiente, en un ensayo de actividad antiinflamatoria.

5

En ciertas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene más de 2 veces la actividad de un polipéptido de HRS no modificado o modificado de forma diferente correspondiente, en un ensayo de actividad antiinflamatoria.

- 10 En ciertas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene una estabilidad que es al menos un 30 % mayor que un polipéptido de HRS no modificado o modificado de forma diferente correspondiente, cuando se comparan en condiciones similares a temperatura ambiente, durante 7 días en PBS a pH 7,4.

- Los ejemplos específicos de polipéptidos de fusión HRS-Fc pueden comprender al menos una de las
- 15 SEQ ID NO:107-110 o 337-338 o 349-350 o 381-390 o 396, o una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 90 %, 95 %, 98 % idéntica a la SEQ ID NO:107-110 o 337-338 o 349-350 o 381-390 o 396. Las SEQ ID NO:107 y 338 son las secuencias de aminoácidos de polipéptidos de fusión Fc C-terminales ejemplares respecto a los residuos 1-60 de la SEQ ID NO:1 (HRS(1-60)_Fc); las SEQ ID NOS:108 y 337 son las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de fusión Fc N-terminales ejemplares respecto a los residuos 1-60 de la SEQ ID NO:1 (Fc_HRS(1-60)); la SEQ ID NO:109 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de fusión Fc C-terminal ejemplar respecto a los residuos 1-506 de la SEQ ID NO:1 (HRS(1-506)_Fc); y la SEQ ID NO:110 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de fusión Fc N-terminal ejemplar respecto a los residuos 1-506 de la SEQ ID NO:1 (Fc_HRS(1-506)).
- 20

- 25 En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene una actividad antiinflamatoria, por ejemplo, en un ensayo basado en células o tras la administración a un sujeto.

- También se incluyen composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas o terapéuticas, que comprenden un polipéptido de fusión HRS-Fc descrito en el presente documento y un portador o excipiente farmacéuticamente
- 30 aceptable o de calidad farmacéutica. En algunas composiciones, el polipéptido es al menos aproximadamente un 95 % puro y menos de aproximadamente un 5 % agregado. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se formula para administración por vía oral, subcutánea, intranasal, pulmonar o parental. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la composición comprende un vehículo de administración seleccionado del grupo que consiste en liposomas, micelas, emulsiones y células.
- 35

- En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición es para uso en a) tratar una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria, b) reducir la inflamación muscular o pulmonar asociada opcionalmente con una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, c) inducir tolerancia a un autoantígeno de histidil-ARNt sintetasa (HRS), d) eliminar un conjunto o subconjunto de linfocitos T implicados en una respuesta autoinmunitaria a un autoantígeno
- 40 de HRS, e) reducir la inflamación tisular en un sujeto, opcionalmente de tejido, muscular, pulmonar y/o cutáneo, f) tratar una distrofia muscular, g) tratar rabdomiólisis, atrofia muscular progresiva, caquexia, inflamación muscular o lesión muscular, y/o h) tratar una enfermedad asociada con un autoanticuerpo.

- También se incluyen regímenes de dosificación que mantienen una concentración promedio en situación de
- 45 equilibrio de un polipéptido de fusión histidil-ARNt sintetasa (HRS)-Fc en el plasma de un sujeto de entre aproximadamente 300 pM y aproximadamente 1000 nM cuando se usa un intervalo de dosificación de 3 días o más, que comprende administrar al sujeto una composición terapéutica o un polipéptido de fusión HRS-Fc descritos en el presente documento.

- 50 Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos para mantener niveles de polipéptido de fusión histidil-ARNt sintetasa (HRS)-Fc por encima del nivel terapéutico efectivo mínimo en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar al sujeto una composición terapéutica o un polipéptido de fusión HRS-Fc descritos en el presente documento.

- 55 También se incluyen procedimientos para tratar una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmunitaria en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar al sujeto una composición terapéutica o un polipéptido de fusión HRS-Fc descritos en el presente documento.

- Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos para reducir la inflamación muscular o
- 60 pulmonar asociada con una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria en un sujeto que lo necesite, que

comprenden administrar al sujeto una composición terapéutica o un polipéptido de fusión HRS-Fc descritos en el presente documento.

5 Ciertas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos para inducir tolerancia a un autoantígeno de histidil-ARNt sintetasa (HRS) en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar al sujeto una composición terapéutica o un polipéptido de fusión HRS-Fc descritos en el presente documento.

10 Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos para eliminar un conjunto o subconjunto de linfocitos T implicados en una respuesta autoinmunitaria a un autoantígeno de histidil-ARNt sintetasa (HRS) en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar al sujeto una composición terapéutica o un polipéptido de fusión HRS-Fc descritos en el presente documento.

15 También se incluyen procedimientos de reducción de la inflamación tisular en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar al sujeto una composición terapéutica o un polipéptido de fusión HRS-Fc descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el tejido se selecciona de entre músculo, intestino, cerebro, pulmón y piel.

20 Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de tratamiento de una distrofia muscular en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar al sujeto una composición terapéutica o un polipéptido de fusión HRS-Fc descritos en el presente documento. En realizaciones particulares de la presente descripción, la distrofia muscular se selecciona de entre distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular de la cintura y los miembros, distrofia muscular facioescapulohumeral, distrofia miotónica, distrofia muscular oculofaríngea, distrofia muscular distal y distrofia muscular congénita.

25 Ciertas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de tratamiento de rabdomiolisis, atrofia muscular progresiva, caquexia, inflamación muscular o lesión muscular en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar al sujeto una composición terapéutica o un polipéptido de fusión HRS-Fc descritos en el presente documento.

30 Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de tratamiento de una enfermedad asociada con un autoanticuerpo, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una composición o un polipéptido AARS/HRS descritos en el presente documento. En algunas realizaciones de la presente descripción, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en miopatías inflamatorias, incluyendo miopatías inflamatorias, 35 polimiositis, dermatomiositis y trastornos relacionados, superposición de polimiositis-esclerodermia, miositis por cuerpos de inclusión (MCI), síndrome anti-sintetasa, enfermedad pulmonar intersticial, artritis y fenómeno de Reynaud. En algunas realizaciones de la presente descripción, la composición se administra al sujeto antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad. En algunas realizaciones de la presente descripción, el autoanticuerpo es específico para histidil-ARNt sintetasa. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de 40 HRS comprende al menos un epítipo de la histidil-ARNt sintetasa reconocido por el autoanticuerpo específico de la enfermedad. En algunas realizaciones de la presente descripción, el epítipo es un epítipo inmunodominante reconocido por anticuerpos en sueros del sujeto. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS bloquea la unión del autoanticuerpo a la histidil-ARNt sintetasa nativa. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS causa la eliminación clonal de linfocitos T autorreactivos. En algunas 45 realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS causa la inactivación funcional de los linfocitos T implicados en la respuesta autoinmunitaria. En algunas realizaciones de la presente descripción, la administración del polipéptido de HRS da como resultado una inflamación reducida de los músculos o los pulmones. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS induce tolerancia a un autoantígeno.

50 En ciertas realizaciones de la presente descripción, la composición se formula para administración por vía oral, intranasal, pulmonar, intramuscular o parental.

También se incluyen polinucleótidos aislados, que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un conjugado o polipéptido de fusión HRS-Fc descrito en el presente documento, incluyendo vectores que comprenden 55 dichos polinucleótidos y células huésped que comprenden dichos polinucleótidos y/o vectores.

Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos para fabricar un polipéptido de fusión HRS-Fc descrito en el presente documento, que comprenden a) cultivar una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped de *E. coli* K-12) para expresar un polipéptido de fusión HRS-Fc, donde la célula huésped comprende un 60 polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión HRS-Fc descrito en el presente documento, que está unido

operativamente a un elemento regulador; y b) aislar el polipéptido de fusión HRS-Fc a partir de la célula huésped. En realizaciones específicas de la presente descripción, la cepa de *E. coli* K-12 se selecciona de entre W3110 y UT5600.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención. La puesta en práctica de la presente descripción empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, procedimientos convencionales de biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro del alcance de la técnica, muchos de los cuales se describen a continuación con fines ilustrativos. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª Edición, 2000); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications* (P. Herdewijn, ed., 2004); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Nucleic Acid Hybridization: Modern Applications* (Buzdin and Lukyanov, eds., 2009); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Freshney, R.I. (2005) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 5ª Ed. Hoboken NJ, John Wiley & Sons; B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (3ª Edición 2010); Farrell, R., *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization* (3ª Edición 2005). *Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications*, ACS, Washington, 1997; Veronese, F., and J.M. Harris, Eds., *Peptide and protein PEGylation, Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(4) 453-609 (2002); Zalipsky, S., y col., «Use of functionalized Poly(Ethylene Glycols) for modification of polypeptides» en *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la materia a los que pertenece la presente descripción. Aunque puede usarse cualquier procedimiento y material similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o a prueba de la presente descripción, se describen procedimientos y materiales preferidos. Para los fines de la presente descripción, los siguientes términos se definen a continuación.

Los artículos «un» y «una» se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos a uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, «un elemento» significa un elemento o más de un elemento.

Por «aproximadamente» se entiende una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía hasta el 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

Como se usa en el presente documento, el término «aminoácido» pretende significar tanto aminoácidos de origen natural como de origen no natural, así como análogos y miméticos de aminoácidos. Los aminoácidos de origen natural incluyen los 20 (L)-aminoácidos utilizados durante la biosíntesis de proteínas, así como otros tales como 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, desmosina, isodesmosina, homocisteína, citrulina y ornitina, por ejemplo. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, por ejemplo, (D)-aminoácidos, norleucina, norvalina, p-fluorofenilalanina, etionina y similares, que son conocidos por los expertos en la materia. Los análogos de aminoácidos incluyen formas modificadas de aminoácidos de origen natural y de origen no natural. Dichas modificaciones pueden incluir, por ejemplo, la sustitución o reemplazo de grupos y restos químicos en el aminoácido o por derivatización del aminoácido. Los miméticos de aminoácidos incluyen, por ejemplo, estructuras orgánicas que exhiben propiedades funcionalmente similares tales como características de carga y separación de carga del aminoácido de referencia. Por ejemplo, una estructura orgánica que imita a la arginina (Arg o R) tendría un resto con carga positiva ubicado en un espacio molecular similar y que tiene el mismo grado de movilidad que el grupo e-amino de la cadena lateral del aminoácido Arg natural. Los miméticos también incluyen estructuras restringidas para mantener la separación y las interacciones de carga óptimas del aminoácido o de los grupos funcionales del aminoácido. Los expertos en la materia saben o pueden determinar qué estructuras constituyen análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos funcionalmente equivalentes.

Como se usa en el presente documento, un sujeto «en riesgo» de desarrollar una enfermedad o reacción adversa puede o no tener una enfermedad detectable, o síntomas de la enfermedad, y puede o no haber mostrado una enfermedad detectable o síntomas de la enfermedad antes de los procedimientos de tratamiento descritos en el presente documento. «En riesgo» denota que un sujeto tiene uno o más factores de riesgo, que son parámetros

medibles que se correlacionan con el desarrollo de una enfermedad, como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica. Un sujeto que tenga uno o más de estos factores de riesgo tiene una mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad, o una reacción adversa, que un sujeto sin uno o más de estos factores de riesgo.

- 5 Una «**enfermedad autoinmunitaria**» como se usa en el presente documento es una enfermedad o trastorno que surge de y está dirigida contra los propios tejidos de un individuo. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, aunque sin limitarse a, respuestas inflamatorias tales como enfermedades inflamatorias de la piel que incluyen psoriasis y dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); esclerodermia y esclerosis sistémicas; respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria intestinal (tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa);
- 10 síndrome de dificultad respiratoria (incluyendo síndrome de dificultad respiratoria del adulto; SDRA); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis colitis; glomerulonefritis; afecciones alérgicas tales como eccema y asma y otras afecciones que implican la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia de adhesión de leucocitos; artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (LES); diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes mellitus tipo I o diabetes mellitus dependiente de insulina); esclerosis múltiple; síndrome de Reynaud;
- 15 tiroiditis autoinmunitaria; encefalomiелitis alérgica; síndrome de Sjorgen; diabetes de inicio juvenil; y respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T que se encuentran típicamente en la tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, miopatías inflamatorias, enfermedad pulmonar intersticial, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que implican diátesis leucocitaria; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC); síndrome de lesión multiorgánica;
- 20 anemia hemolítica (que incluye, aunque sin limitarse a, crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs); miastenia grave; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; enfermedad de la membrana basal anti-glomerular; síndrome anti-fosfolípido; neuritis alérgica; enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; penfigoide bulloso; pénfigo; poliendocrinopatías autoinmunitarias; enfermedad de Reiter; síndrome de la persona rígida; enfermedad de Behcet; arteritis de células gigantes; nefritis por complejos inmunitarios; nefropatía por IgA; polineuropatías por IgM; púrpura trombocitopénica inmunitaria (PTI) o trombocitopenia autoinmunitaria, etc.

- En toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que las palabras «**comprenden**», «**comprende**» y «**que comprende**» implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos enunciados, pero no la exclusión de ninguna otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. Por «**que consiste en**» se entiende que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase «que consiste en».
- 30 Por lo tanto, la frase «que consiste en» indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no puede haber otros elementos presentes. Por «**que consiste esencialmente en**» se entiende que incluye todos los elementos enumerados después de la frase, y está limitado a otros elementos que no interfieran en o contribuyan a la actividad o acción especificada en la presente descripción para los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase
- 35 «que consiste esencialmente en» indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o no materialmente a la actividad o acción de los elementos enumerados.

- El término «**eliminación clonal**» se refiere a la eliminación (por ejemplo, pérdida o muerte) de linfocitos T autorreactivos. La eliminación clonal se puede conseguir de manera central en el timo, en la periferia, o en ambos.
- 40

- El término «**conjugado**» pretende referirse a la entidad formada como resultado de la unión covalente de una molécula, por ejemplo, una molécula biológicamente activa (por ejemplo, polipéptido de HRS), a una región Fc de inmunoglobulina. Un ejemplo de un polipéptido conjugado es una «**proteína de fusión**» o «**polipéptido de fusión**»,
- 45 es decir, un polipéptido que se crea a través de la unión de dos o más secuencias codificantes, que originalmente codificaron polipéptidos independientes; la traducción de las secuencias codificantes unidas da como resultado un único polipéptido de fusión, típicamente con propiedades funcionales derivadas de cada uno de los polipéptidos independientes.

- 50 La mención «**libre de endotoxinas**» o «**sustancialmente libre de endotoxinas**» se refiere, en general, a composiciones, disolventes y/o recipientes que contienen, como máximo, cantidades traza (por ejemplo, cantidades que no tienen efectos fisiológicos clínicamente adversos para un sujeto) de endotoxina, y preferentemente cantidades indetectables de endotoxina. Las endotoxinas son toxinas asociadas con ciertas bacterias, típicamente bacterias gram negativas, aunque las endotoxinas pueden encontrarse en bacterias gram positivas, tales como
- 55 *Listeria monocytogenes*. Las endotoxinas más prevalentes son lipopolisacáridos (LPS) o lipooligosacáridos (LOS) que se encuentran en la membrana externa de diversas bacterias gram negativas, y que representan una característica patógena central en la capacidad de estas bacterias para causar la enfermedad. Pequeñas cantidades de endotoxina en los seres humanos pueden producir fiebre, una disminución de la presión arterial y la activación de la inflamación y la coagulación, entre otros efectos fisiológicos adversos.

60

Por lo tanto, en la producción farmacéutica, a menudo es deseable eliminar la mayoría o todos los rastros de endotoxina de medicamentos y/o recipientes de medicamentos, ya que incluso pequeñas cantidades pueden causar efectos adversos en los seres humanos. Se puede usar un horno de despirogenación para este fin, ya que típicamente se requieren temperaturas superiores a 300 °C para descomponer la mayoría de las endotoxinas. Por ejemplo, basándose en el material de envasado primario, tal como jeringas o viales, la combinación de una temperatura vítrea de 250 °C y un tiempo de mantenimiento de 30 minutos a menudo es suficiente para conseguir una reducción de 3 log en los niveles de endotoxinas. Se contemplan otros procedimientos para eliminar endotoxinas, que incluyen, por ejemplo, procedimientos de cromatografía y filtración, como se describen en el presente documento y se conocen en la técnica. También se incluyen procedimientos para producir conjugados HRS-Fc y aislarlos de células eucariotas, tales como células de mamífero, para reducir, si no eliminar, el riesgo de que estén presentes endotoxinas en una composición de la presente descripción. Se prefieren los procedimientos de producir conjugados HRS-Fc y aislarlos a partir de células libres de suero.

Las endotoxinas pueden detectarse usando técnicas de rutina conocidas en la técnica. Por ejemplo, el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus*, que usa sangre del cangrejo herradura, es un ensayo muy sensible para detectar la presencia de endotoxinas. En esta prueba, niveles muy bajos de LPS pueden causar una coagulación detectable del lisado del limulus debido a una potente cascada enzimática que amplifica esta reacción. Las endotoxinas también se pueden cuantificar mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Para estar sustancialmente libre de endotoxinas, los niveles de endotoxinas pueden ser inferiores a aproximadamente 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08, 0,09, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 UE/ml. Típicamente, 1 ng de lipopolisacárido (LPS) corresponde a aproximadamente 1-10 UE.

Como se usan en el presente documento, los términos «**función**» y «**funcional**» y similares se refieren a una función biológica, enzimática o terapéutica.

«**Homología**» se refiere al porcentaje de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservativas. La homología se puede determinar usando programas de comparación de secuencias tales como GAP (Deveraux y col., *Nucleic Acids Research*. 12, 387-395, 1984). De esta manera, las secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en el presente documento podrían compararse mediante la inserción de huecos en el alineamiento, determinándose dichos huecos, por ejemplo, mediante el algoritmo de comparación usado por GAP.

Un enlazador «**fisiológicamente estable**» se refiere a un enlazador que es sustancialmente estable en agua o en condiciones fisiológicas (por ejemplo, condiciones de cultivo *in vivo*, *in vitro*, por ejemplo, en presencia de una o más proteasas), es decir, no experimenta una reacción de degradación (por ejemplo, una reacción degradable enzimáticamente) en condiciones fisiológicas en cualquier grado apreciable durante un período de tiempo prolongado. En general, un enlazador fisiológicamente estable es uno que muestra una tasa de degradación de menos de aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 % o aproximadamente el 5 % por día en condiciones fisiológicas.

Por «**aislado**» se entiende material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un «péptido aislado» o un «polipéptido aislado» y similares, como se usan en el presente documento, incluye el aislamiento y/o la purificación *in vitro* de una molécula peptídica o polipeptídica a partir de su entorno celular natural, y a partir de la asociación con otros componentes de la célula; es decir, no está significativamente asociado con sustancias *in vivo*.

La expresión «**concentración efectiva semimáxima**» o «**CE₅₀**» se refiere a la concentración de un conjugado HRS-Fc descrito en el presente documento donde induce una respuesta a mitad de camino entre el valor inicial y el máximo después de cierto tiempo de exposición especificado; la CE₅₀ de una curva de respuesta a la dosis graduada, por lo tanto, representa la concentración de un compuesto a la que se observa el 50 % de su efecto máximo. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la CE₅₀ de un agente proporcionado en el presente documento se indica en relación con una actividad «no canónica», como se ha indicado anteriormente. La CE₅₀ también representa la concentración plasmática requerida para obtener el 50 % de un efecto máximo *in vivo*. De manera similar, la «CE₉₀» se refiere a la concentración de un agente o composición a la cual se observa el 90 % de su efecto máximo. La «CE₉₀» se puede calcular a partir de la «CE₅₀» y la pendiente de Hill, o se puede determinar a partir de los datos directamente, usando el conocimiento de rutina en la técnica. En algunas realizaciones de la presente descripción, el valor de CE₅₀ de un conjugado HRS-Fc es inferior a aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 nM. Preferentemente, la composición bioterapéutica tendrá un valor de CE₅₀ de aproximadamente 1 nM o menos.

La «**semivida**» de un conjugado HRS-Fc puede referirse al tiempo que tarda el conjugado en perder la mitad de su actividad farmacológica, fisiológica u otra, con respecto dicha actividad en el momento de la administración al suero o tejido de un organismo, o con respecto a cualquier otro punto temporal definido. «Semivida» también puede referirse al tiempo que tarda la cantidad o la concentración de un conjugado HRS-Fc en reducirse a la mitad de la cantidad de partida administrada al suero o tejido de un organismo, con respecto a dicha cantidad o concentración en el momento de la administración al suero o tejido de un organismo, o con respecto a cualquier otro punto temporal definido. La semivida puede medirse en suero y/o en uno o más tejidos seleccionados.

- 10 El término «**enlace**», «**enlazador**», «**resto enlazador**» o «**L**» se usa en el presente documento para referirse a un enlazador que se puede usar para separar un polipéptido de HRS de otro polipéptido de HRS y/o de una o más regiones Fc. El enlazador puede ser fisiológicamente estable o puede incluir un enlazador liberable tal como un enlazador enzimáticamente degradable (por ejemplo, enlazadores escindibles proteolíticamente). En ciertos aspectos de la presente descripción, el enlazador puede ser un enlazador peptídico, por ejemplo, como parte de una proteína de fusión HRS-Fc. En algunos aspectos de la presente descripción, el enlazador puede ser un enlazador no peptídico.

- Los términos «**modular**» y «**alterar**» incluyen «aumentar», «mejorar» o «estimular», así como «disminuir» o «reducir», típicamente en una cantidad o grado estadísticamente significativo o fisiológicamente significativo con respecto a un control. Una cantidad «**aumentada**», «**estimulada**» o «**mejorada**» es típicamente una cantidad «estadísticamente significativa», y puede incluir un aumento de 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales intermedios y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad producida sin composición (por ejemplo, en ausencia de cualquiera de los conjugados HRS-Fc de la presente descripción) o una composición de control, muestra o sujeto de prueba. Una cantidad «**disminuida**» o «**reducida**» es típicamente una cantidad «estadísticamente significativa», y puede incluir un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de disminución en la cantidad producida sin composición (la ausencia de un agente o compuesto) o una composición de control, incluyendo todos los números enteros intermedios. Como un ejemplo no limitante, un control en la comparación de actividades canónicas y no canónicas podría incluir el conjugado HRS-Fc de interés en comparación con un polipéptido de HRS no modificado o modificado de forma diferente correspondiente (secuencialmente). Otros ejemplos de comparaciones y cantidades «estadísticamente significativas» se describen en el presente documento.

- 35 Actividad «**no canónica**» como se usa en el presente documento, se refiere en general a i) una nueva actividad no de aminoacilación que posee el polipéptido de HRS de la presente descripción que no posee en ningún grado significativo la proteína parental de longitud completa nativa intacta, o ii) una actividad que posea la proteína parental de longitud completa nativa intacta, donde el polipéptido de HRS exhibe una actividad específica significativamente mayor (por ejemplo, al menos un 20 % mayor) con respecto a la actividad no canónica en comparación con la proteína parental de longitud completa nativa intacta, o exhibe la actividad en un nuevo contexto; por ejemplo, aislando la actividad de otras actividades que posee la proteína parental de longitud completa nativa intacta. En el caso de los polipéptidos de HRS, los ejemplos no limitantes de actividades no canónicas incluyen la señalización extracelular incluyendo la modulación de la proliferación celular, modulación de la migración celular, modulación de la diferenciación celular (por ejemplo, hematopoyesis, neurogénesis, miogénesis, osteogénesis y adipogénesis), modulación de la transcripción génica, modulación de la apoptosis u otras formas de muerte celular, modulación de la señalización celular, modulación de la captación o secreción celular, modulación de la angiogénesis, modulación de la unión celular, modulación del metabolismo celular, modulación de la producción o actividad de citocinas, modulación de la actividad del receptor de citocinas, modulación de la inflamación, inmunogenicidad y similares.

- 50 En ciertas realizaciones de la presente descripción, la «**pureza**» de cualquier agente dado (por ejemplo, conjugado HRS-Fc, tal como una proteína de fusión) en una composición puede definirse específicamente. Por ejemplo, ciertas composiciones pueden comprender un agente que es al menos un 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % puro, incluyendo todos los decimales intermedios, de acuerdo con lo medido, por ejemplo y en absoluto limitante, mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), una forma bien conocida de cromatografía en columna usada frecuentemente en bioquímica y química analítica para separar, identificar y cuantificar compuestos.

- 60 Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, un «**enlazador enzimáticamente degradable**» significa un enlazador, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que está sujeta a degradación por una o más enzimas, por ejemplo, peptidasas o proteasas.

Los términos «**polipéptido**» y «**proteína**» se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos del mismo. Por lo tanto, estos términos se aplican a polímeros de aminoácidos donde uno o más residuos de aminoácidos son aminoácidos de origen no natural sintéticos, tales como un análogo químico de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural.

Un «**enlazador liberable**» incluye, aunque sin limitarse a, un enlazador fisiológicamente escindible y un enlazador enzimáticamente degradable. Por lo tanto, un «enlazador liberable» es un enlazador que puede experimentar hidrólisis espontánea, o escisión por algún otro mecanismo (por ejemplo, catalizada por una enzima, catalizada por un ácido, catalizada por una base, y así sucesivamente) en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, un «enlazador liberable» puede implicar una reacción de eliminación que tiene una abstracción de base de un protón, (por ejemplo, un átomo de hidrógeno ionizable, H α), como fuerza impulsora. Para los fines del presente documento, un «enlazador liberable» es sinónimo de un «enlazador degradable». En realizaciones particulares de la presente descripción, un enlazador liberable tiene una semivida a pH 7,4, 25 °C, por ejemplo, un pH fisiológico, temperatura del cuerpo humano (por ejemplo, *in vivo*), de aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 hora, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas o aproximadamente 96 horas o más.

Por «**estadísticamente significativo**», se entiende que es poco probable que el resultado se haya producido por casualidad. La significación estadística puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Las medidas de significación comúnmente usadas incluyen el valor p, que es la frecuencia o probabilidad con la que se produciría el acontecimiento observado, si la hipótesis nula fuera cierta. Si el valor de p obtenido es menor que el nivel de significación, entonces se rechaza la hipótesis nula. En casos simples, el nivel de significación se define a un valor p de 0,05 o menos.

El término «**solubilidad**» se refiere a la propiedad de un polipéptido conjugado HRS-Fc proporcionado en el presente documento para disolverse en un disolvente líquido y formar una solución homogénea. La solubilidad se expresa típicamente como una concentración, ya sea por masa de soluto por unidad de volumen de disolvente (g de soluto por kg de disolvente, g por dl (100 ml), mg/ml, etc.), molaridad, molalidad, fracción molar u otras descripciones similares de concentración. La cantidad máxima en equilibrio de soluto que puede disolverse por cantidad de disolvente es la solubilidad de ese soluto en ese disolvente en las condiciones especificadas, incluyendo temperatura, presión, pH y la naturaleza del disolvente. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la solubilidad se mide a pH fisiológico u otro pH, por ejemplo, a pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0 o pH 7,4. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la solubilidad se mide en agua o un tampón fisiológico tal como PBS o NaCl (con o sin NaP). En realizaciones específicas de la presente descripción, la solubilidad se mide a un pH relativamente más bajo (por ejemplo, pH 6,0) y una sal relativamente más alta (por ejemplo, NaCl 500 mM y NaP 10 mM). En ciertas realizaciones de la presente descripción, la solubilidad se mide en un fluido (disolvente) biológico tal como sangre o suero. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la temperatura puede ser aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25 °C) o aproximadamente temperatura corporal (37 °C). En ciertas realizaciones de la presente descripción, un polipéptido conjugado HRS-Fc tiene una solubilidad de al menos aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 o 30 mg/ml a temperatura ambiente o a 37 °C.

Un «**sujeto**», como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal que exhibe un síntoma, o que esté en riesgo de exhibir un síntoma, que pueda tratarse o diagnosticarse con un polipéptido conjugado HRS-Fc de la presente descripción. Los sujetos (pacientes) adecuados incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o un perro). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, pacientes humanos.

«**Sustancialmente**» o «**esencialmente**» significa casi total o completamente, por ejemplo, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de alguna cantidad dada.

«**Tratamiento**» o «**tratar**», como se usa en el presente documento, incluye cualquier efecto deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o afección, y puede incluir incluso cambios o mejoras mínimos en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que está siendo tratada. «Tratamiento» o «tratar» no necesariamente indica la erradicación o curación completa de la enfermedad o afección, o síntomas asociados de la misma. El sujeto que recibe este tratamiento es cualquier sujeto que lo necesite. Marcadores ejemplares de mejoría clínica serán evidentes para los expertos en la materia.

Polipéptidos derivados de histidil-ARNt sintetasa

- Realizaciones de la presente descripción se refieren a conjugados de polipéptidos de histidil-ARNt sintetasa («polipéptidos de HRS o de HisRS»)-Fc, incluidos conjugados HRS-Fc que comprenden secuencias de HRS de tipo silvestre, secuencias de origen natural, secuencias de origen no natural y/o variantes y fragmentos de las mismas. Los ejemplos específicos de polipéptidos derivados de HRS incluyen aquellos con contenido de cisteína alterado. Las histidil-ARNt sintetasa pertenecen a la familia de la ARNt sintetasa de clase II, que tiene tres motivos de secuencia altamente conservados. Las ARNt sintetasa de clase I y II son ampliamente reconocidas como responsables de la unión específica de un aminoácido a su ARNt análogo en una reacción de dos etapas: el aminoácido (AA) es activado primero por ATP para formar AA-AMP y a continuación es transferido al extremo aceptor del ARNt. Las histidil-ARNt sintetasa de longitud completa existen típicamente como un homodímero citosólico o una forma mitocondrial sometida a splicing de forma alternativa.
- Más recientemente, se ha establecido que algunos fragmentos biológicos, o isoformas sometidas a splicing de forma alternativa de histidil-ARNt sintetasa eucariotas (fisiocrinas, o polipéptidos de HRS), o en algunos contextos la sintetasa intacta, modulan ciertas vías de señalización celular, o tienen propiedades antiinflamatorias. Estas actividades, que son distintas del papel clásico de las ARNt sintetasa en la síntesis de proteínas, se denominan colectivamente en el presente documento «actividades no canónicas». Estas fisiocrinas pueden producirse naturalmente mediante splicing alternativo o proteólisis, y pueden actuar de forma autónoma celular (es decir, dentro de la célula huésped) o de manera autónoma no celular (es decir, fuera de la célula huésped) para regular diversos mecanismos homeostáticos. Por ejemplo, como se proporciona en la presente descripción, los polipéptidos de HRS tales como el fragmento N-terminal de histidil-ARNt sintetasa (por ejemplo, HRS 1-48, HRS 1-60) son capaces, entre otras cosas, de ejercer una señal antiinflamatoria bloqueando la migración, activación o diferenciación de células inflamatorias (por ejemplo, monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B) asociadas con los sitios de inflamación activa *in vivo*. Además, ciertas mutaciones o eliminaciones (por ejemplo, HRS 1-506, HRS 1-60) relativas a la secuencia del polipéptido de HRS de longitud completa confieren un aumento de las actividades y/o una mejora de las propiedades farmacológicas. Las secuencias de ciertos polipéptidos de HRS ejemplares se proporcionan en la **tabla D1**.

Tabla D1			
Polipéptido de HRS ejemplares			
Nombre	Tipo/esp ecie/ Residuo s	Secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos	SEQ ID N O:
Fisiocrinas N-terminales			
FL citosólico tipo silvestre	Proteína/ Humana/	MAERAALEELVKLQGERVRLKQQKASAELEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTDRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFEKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSRLRYDLTPFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKLLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPLCIC	1

FL mitocondrial tipo silvestre	Proteína/ Humana/	MPLLGLLPRAWASLLSQLLRPPCASCTGAVRCQSQVAEAV LTSQLKAHQEKPNFIKTPKGTRDLSPQHMMVREKILDLVISC FKRHGAKGMDTPAFELKETLTEKYGEDSGLMYDLKDQGG LLSLRYDLTVPFARYLAMNKVKMKRYHVGKVVWRRESPTI VQGRYREFCQCDFDIAGQFDPMPDAECLKIMCEILSGLQLG DFLIKVNDRRIVDGMFAVCGVPESKFRAICSSIDKLDKMAW KDVRHEMVMVKKGLAPEVADRIGDYVQCHGGVSLVEQMFQ DPRLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIADKISFDLSLARG LDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLNVGSVAAGGRYDGLV GMFDPKGHKVPCVGLSIGVERIFYVEQRMKTKGEKVRTTE TQVFVATPQKNFLQERLKLIAELWDSGIKAEMLYKNNPKLL TQLHYCESTGIPLVVIIGEQLKEGVKIRSVASREEVAIKREN FVAEIQRKRLSES	2
HisRS1 ^{N1}	Proteína/ Humana/ 1-141	MAERAALLELVKLQGERVRGLKQKASAELEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAM	3
HisRS1 ^{N2}	Proteína/ Humana/ 1-408	MAERAALLELVKLQGERVRGLKQKASAELEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQCHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTE	4
HisRS1 ^{N3}	Proteína/ Humana/ 1-113	MAERAALLELVKLQGERVRGLKQKASAELEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKL	5
HisRS1 ^{N4}	Proteína/ Humana/ 1-60	MAERAALLELVKLQGERVRGLKQKASAELEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPK	6
HisRS1 ^{N5}	Proteína/ Humana/ 1-243 + 27aa	MAERAALLELVKLQGERVRGLKQKASAELEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVGYP WWNSCSRILNYPKTSRPWRAWET	7
Fisiocrinas C-terminales			
Nombre	Tipo/especie/residuos	Secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos	SEQ ID N O.
HisRS1 ^{C1}	Proteína/ Humana/ 405-509	RTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSSELWDAGIKAELLYKK NPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVILKRSVTSREE VDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	8

HisRS1 ^{C2}	Proteína/ Humana/ 1-60+ 175-509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKDFDIAGNFDPMIPDAECLKIM CEILSSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSV DKLDKVSWEDEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGG VSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLFGIDDK ISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVA AGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEA LEEKIRTTETQVLVASAQKKLEERLKL VSELWDAGIKAEL LYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRVS TSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	9
HisRS1 ^{C3}	Proteína/ Humana/ 1-60 + 211-509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKVNDRRILDGMFAICGVSDSK FRTICSSVDKLDKVSWEDEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDY VQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPL GVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFI VEQRLEALEEKIRTTETQVLVASAQKKLEERLKL VSELW DAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKD GVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	10
HisRS1 ^{C4}	Proteína/ Humana/ 1-100 + 211-509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI IRCFKRHGAEVIDTPVFELKVNDRRILDGMFAICGVSDSKF RTICSSVDKLDKVSWEDEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYV QQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT FGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPL GVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFI VEQRLEALEEKIRTTETQVLVASAQKKLEERLKL VSELW DAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKD GVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	11
HisRS1 ^{C5}	Proteína/ Humana/ 1-174+ 211-509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI IRCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQG GELLSLRYDLTPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNP AMTRGRYREFYQCVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSV DKLDKVSWEDEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGG VSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLFGIDDK ISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVA AGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEA LEEKIRTTETQVLVASAQKKLEERLKL VSELWDAGIKAEL LYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRVS TSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	12

HisRS1 ^{C6}	Proteína/ Humana/ 1-60 + 101-509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQ GGELLSLRYDLTPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDN PAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDP MIPDAECLKIMCEILSS LQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLD KVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVE QLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDL SLARGLDYTTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGR YDGLVGMFDPKGRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKI RTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKK NPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREE VDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	13
HisRS1 ^{C7}	Proteína/ Humana/ 1-100 + 175-509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGT RDYSPRQMAVREKVFDVI IRCFKRHGA EVIDTPVFELKDFDIAGNFDP MIPDAECLKIMC EILSSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSV DKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGG VSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDK ISFDLSLARGLDYTTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVA AGGRYDGLVGMFDPKGRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEA LEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAEL LYKKNP KLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSV TSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	14
HisRS1 ^{C8}	Proteína/ Humana/ 1-60 + 399-509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKALEEKIRTTETQVL VASAQK KLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNP KLLNQLQYCEE AGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKR RTGQPLCIC	15
HisRS1 ^{C9}	Proteína/ Humana/ 1-100 + 399-509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGT RDYSPRQMAVREKVFDVI IRCFKRHGA EVIDTPVFELKALEEKIRTTETQVL VASAQK LLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNP KLLNQLQYCEE AGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKR TGQPLCIC	16
HisRS1 ^{C10}	Proteína/ Humana/ 369-509	MFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQ VL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNP KLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRRE DLVEEIKRRTGQPLCIC	17
Fisiocrinas internas			
Nombre	Tipo/espe- cie/ residuos	Secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos	SEQ ID N O.
HisRS1 ¹¹	Proteína/ Humana/ 191-333	CLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFR TICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYV QQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT L FGIDDKISFDLSLARGLDYTTG	18

Se han secuenciado una serie de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de histidil-ARNt sintetasa y variantes de origen natural del gen humano, y se sabe en la técnica que son al menos parcialmente funcionalmente intercambiables. Varias de dichas variantes de histidil-ARNt sintetasa (es decir, SNP de histidil ARNt sintetasa 5 representativos) se muestran en la **tabla D2**.

Tabla D2 SNP de histidil ARNt sintetasa humana			
Número de acceso al Gene Bank	Cambio de nucleótidos	Número de acceso al Gene Bank	Cambio de nucleótidos
rs193103291	A/G	rs186312047	A/G
rs192923161	C/T	rs186176857	C/T
rs192784934	A/G	rs186043734	C/G
rs192164884	A/G	rs185867584	C/T
rs192090865	A/C	rs185828130	A/G
rs192015101	A/T	rs185537686	A/G
rs191999492	A/G	rs185440931	C/T
rs191852363	C/T	rs185100584	A/C
rs191532032	A/T	rs185077558	C/T
rs191391414	C/T	rs184748736	C/G
rs191385862	A/G	rs184591417	C/T
rs191205977	A/G	rs184400035	C/G
rs191104160	A/G	rs184098206	C/T
rs190989313	C/G	rs183982931	C/T
rs190818970	A/T	rs183942045	A/G
rs190476138	C/T	rs183854085	A/G
rs190289555	C/T	rs183430882	G/T
rs190065567	A/G	rs183419967	A/C
rs189624055	C/T	rs183366286	A/G
rs189563577	G/T	rs183084050	C/T
rs189404434	A/G	rs182948878	C/T
rs189268935	A/G	rs182813126	A/G
rs189103453	A/T	rs182498374	A/G
rs188839103	A/G	rs182161259	A/T
rs188766717	A/G	rs182119902	C/T
rs188705391	A/G	rs182106891	C/T
rs188490030	A/G	rs181930530	A/G
rs188345926	C/T	rs181819577	A/G
rs188174426	A/G	rs181706697	C/T
rs187897435	C/T	rs181400061	G/T
rs187880261	A/G	rs181240610	G/T
rs187729939	G/T	rs181150977	A/C
rs187617985	A/T	rs180848617	A/G
rs187344319	C/T	rs180765564	A/G
rs187136933	C/T	rs151330569	C/G
rs186823043	C/G	rs151258227	C/T
rs186764765	C/T	rs151174822	C/T
rs186663247	A/G	rs150874684	C/T
rs186526524	A/G	rs150589670	A/G
rs150274370	C/T	rs145059663	C/T
rs150090766	A/G	rs144588417	C/T
rs149977222	A/G	rs144457474	A/G
rs149821411	C/T	rs144322728	C/T
rs149542384	A/G	rs143897456	-/C
rs149336018	C/G	rs143569397	G/T
rs149283940	C/T	rs143476664	C/T
rs149259830	C/T	rs143473232	C/G
rs149241235	C/T	rs143436373	G/T
rs149018062	C/T	rs143166254	A/G
rs148935291	C/T	rs143011702	C/G
rs148921342	-/A	rs142994969	A/G
rs148614030	C/T	rs142880704	A/G

ES 2 708 565 T3

rs148584540	C/T	rs142630342	A/G
rs148532075	A/C	rs142522782	-/AAAC
rs148516171	C/T	rs142443502	C/T
rs148394305	-/AA	rs142305093	C/T
rs148267541	C/T	rs142289599	A/G
rs148213958	C/T	rs142088963	A/C
rs147637634	A/G	rs141765732	A/C
rs147372931	A/C/G	rs141386881	A/T
rs147350096	A/C	rs141291994	A/G
rs147288996	C/T	rs141285041	C/T
rs147194882	G/T	rs141220649	C/T
rs147185134	C/T	rs141147961	-/C
rs147172925	A/G	rs141123446	-/A
rs147011612	C/T	rs140516034	A/G
rs147001782	A/G	rs140169815	C/T
rs146922029	C/T	rs140005970	G/T
rs146835587	A/G	rs139699964	C/T
rs146820726	C/T	rs139555499	A/G
rs146801682	C/T	rs139447495	C/T
rs146571500	G/T	rs139364834	-/A
rs146560255	C/T	rs139362540	A/G
rs146205151	-/A	rs139300653	-/A
rs146159952	A/G	rs139251223	A/G
rs145532449	C/G	rs139145072	A/G
rs145446993	A/G	rs138612783	A/G
rs145112012	G/T	rs138582560	A/G
rs138414368	A/G	rs111863295	C/T
rs138377835	A/G	rs111519226	C/G
rs138300828	C/T	rs111314092	C/T
rs138067637	C/T	rs80074170	A/T
rs138035024	A/G	rs79408883	A/C
rs137973748	C/G	rs78741041	G/T
rs137917558	A/G	rs78677246	A/T
rs117912126	A/T	rs78299006	A/G
rs117579809	G/T	rs78085183	A/T
rs116730458	C/T	rs77844754	C/T
rs116411189	A/C	rs77585983	A/T
rs116339664	C/T	rs77576083	A/G
rs116203404	A/T	rs77154058	G/T
rs115091892	G/T	rs76999025	A/G
rs114970855	A/G	rs76496151	C/T
rs114176478	A/G	rs76471225	G/T
rs113992989	C/T	rs76085408	G/T
rs113720830	C/T	rs75409415	A/G
rs113713558	A/C	rs75397255	C/G
rs113627177	G/T	rs74336073	A/G
rs113489608	A/C	rs73791750	C/T
rs113408729	G/T	rs73791749	A/T
rs113255561	A/G	rs73791748	C/T
rs113249111	C/T	rs73791747	A/T
rs113209109	A/G	rs73273304	C/T
rs113066628	G/T	rs73271596	C/T
rs112967222	C/T	rs73271594	C/T
rs112957918	A/T	rs73271591	A/G
rs112859141	A/G	rs73271586	A/T
rs112769834	C/G	rs73271585	A/G
rs112769758	A/C	rs73271584	A/G

ES 2 708 565 T3

rs112701444	A/C	rs73271581	C/T
rs112585944	A/G	rs73271578	A/T
rs112439761	A/G	rs72800925	G/T
rs112427345	A/C	rs72800924	C/T
rs112265354	C/T	rs72800922	A/T
rs112113896	C/G	rs72432753	-/A
rs112033118	C/T	rs72427948	-/A
rs112029988	A/G	rs72388191	-/A
rs72317985	-/A	rs6873628	C/T
rs71583608	G/T	rs5871749	-/C
rs67251579	-/A	rs4334930	A/T
rs67180750	-/A	rs3887397	A/G
rs63429961	A/T	rs3776130	A/C
rs61093427	C/T	rs3776129	C/T
rs61059042	-/A	rs3776128	A/G
rs60936249	-/AA	rs3177856	A/C
rs60916571	-/A	rs2563307	A/G
rs59925457	C/T	rs2563306	A/G
rs59702263	-/A	rs2563305	C/T
rs58302597	C/T	rs2563304	A/G
rs57408905	A/T	rs2530242	C/G
rs35790592	A/C	rs2530241	A/G
rs35609344	-/A	rs2530240	A/G
rs35559471	-/A	rs2530239	A/G
rs35217222	-/C	rs2530235	A/C
rs34903998	-/A	rs2230361	C/T
rs34790864	C/G	rs2073512	C/T
rs34732372	C/T	rs1131046	C/T
rs34291233	-/C	rs1131045	C/G
rs34246519	-/T	rs1131044	C/T
rs34176495	-/C	rs1131043	C/G
rs13359823	A/G	rs1131042	A/C
rs13180544	A/C	rs1131041	C/G
rs12653992	A/C	rs1131040	A/G
rs12652092	A/G	rs1131039	C/T
rs11954514	A/C	rs1131038	A/G
rs11745372	C/T	rs1131037	A/G
rs11548125	A/G	rs1131036	A/G
rs11548124	C/G	rs1131035	C/T
rs11344157	-/C	rs1131034	A/G
rs11336085	-/A	rs1131033	A/G
rs11318345	-/A	rs1131032	A/G
rs11309606	-/A	rs1089305	A/G
rs10713463	-/A	rs1089304	A/C
rs7706544	C/T	rs1065342	A/C
rs7701545	A/T	rs1050252	C/T
rs6880190	C/T	rs1050251	A/T
rs1050250	A/G	rs145769024	-/AAACAAAACAAAACA (SEQ ID NO:164)
rs1050249	C/T	rs10534452	- /AAAAC
rs1050248	A/C/T	rs10534451	-/AAACAAAACA (SEQ ID NO:165)
rs1050247	C/T	rs59554063	-/CAAAACAAAA (SEQ ID NO:166)
rs1050246	C/G	rs58606188	-/CAAAACAAAACAAAA (SEQ ID NO:167)
rs1050245	C/T	rs71835204	(LARGEDELETION)/-

rs1050222	C/T	rs71766955	(LARGEDELETION)/-
rs813897	A/G	rs144998196	-/AAACAAAACA (SEQ ID NO:168)
rs812381	C/G	rs68038188	-/ACAAAACAAA (SEQ ID NO:169)
rs811382	C/T	rs71980275	-/AAAAC
rs801189	C/T	rs71848069	-/AAAC
rs801188	A/C	rs60987104	-/AAAC
rs801187	A/T	rs801185	C/T
rs801186	A/G	rs702396	C/G

Adicionalmente, existen homólogos y ortólogos del gen humano en otras especies, como se enumeran en la **tabla D3** y, por lo tanto, sería un asunto de rutina seleccionar un aminoácido de origen natural o una variante de nucleótido presente en un SNP, u otro homólogo de origen natural en lugar de cualquiera de las secuencias polipeptídicas de HRS humana enumeradas en las **tablas D1, D4-D6 o D8**.

Tabla D3 Homólogos de Histidil ARNt sintetasa humana		
Tipo/es pecie/ residuo s	Secuencias de aminoácidos	SEQ ID NO:
<i>Mus musculus</i>	MADRAALEELVRLQGAHVRLKEQKASAEQIEEEVTKLLKLKAQL GQDEGKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEV IDTPVFELKETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARY LAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDP MIPDAECLKIMCEILSSLQIGNFLVKVNDRRILDGMFAVCGVPDSKFR TICSSVDKLDKVSWEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGV SLVEQLLQDPKLSQNKQAVEGLGDLKLLFEYLILFGIDDKISFDLSLA RGLDYYTGVIYEAVLLQMPTQAGEEPLGVGSIAAGGRYDGLVGMF DPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEAEEKVRTTETQVLVASAQK KLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYWEEAGIPLVAI IGEQLRDGVIKLRSVASREEVDVRREDLVEEIRRTNQLSTC	19
<i>Canis lupus familiaris</i>	MAERAALVRLQGERVRLKQKASAEQIEEEVAKLLKLKAQLG PDEGKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIISCFKRHGAVID TPVFELKETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLA MNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDP PDAECLEIMCEILSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVPDSKFR TICSSVDKLDKVSWEVKNEMVGEKGLAPEVADHIGDYVQQHGGISLV EQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIADKISFDLSLARG LGLDYYTGVIYEAVLLQTPVQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPK GRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEATEEKVRTTETQVLVASAQKLL EERLKLSELWNAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGE QELKDGVIKLRSVASREEVDVPREDLVEEIKRRTSQPFCIC	20
<i>Bos taurus</i>	MADRAALEDLVRVQGERVRLKQKASAEQIEEEVAKLLKLKAQL GPDEGKPKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIISCFKRHGAEVI DTPVFELKETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYL AMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDP MLPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVPDSKFR TICSSVDKLDKVSWEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGV SLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIADKISFDLSLA RGLDYYTGVIYEAVLLQPPARAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMF DPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKVRTTETQVLVASAQK KLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEETGIPLVAI GEQELKDGVIKLRSVASREEVDVRREDLVEEIKRRTSQPLCIC	21

<i>Rattus norvegicus</i>	MADRAALEELVRLQGAHVRLKEQKASAEQIEEEVTKLLKLKAQL GHDEGKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEV IDTPVFELKETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARY LAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDP MIPDAECLKIMCEILSSLQIGNFQVKVNDRRILDGMFAVCGVPDSKF RTICSSVDKLDKVSWEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGG VSLVEQLLQDPKLSQNKQAVEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSL ARGLDYYTGVIYEAVLLQMPTQAGEEPLGVGSIAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQKLEAEEKVRTTETQVLVASAQ KKLLEERLKLISELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI IGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRRREDLVEEIRRRTSQPLSM	22
<i>Gallus</i>	MADEAAVRQQAEEVVRRLKQDKAEPDEIAKEVAKLLEMKAHLGGD EGKHKFVLKTPKGTRDYGPKQMAIRERVFSAIACFKRHGAEVIDTP VFELKETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAM NKITNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDP AECLKIVQEILSDLQLGDFLIKVNDRRILDGMFAVCGVPDSKFR TICSVDKLDKMPWEEVRNEMVGEKGLSPEAADRIGEYVQLHGGMDLIE QLLQDPKLSQNKLVKEGLGDMKLLFEYLTFLGITGKISFDLSLARG LDDYYTGVIYEAVLLQQNDHGEESVSVGSVAGGGRYDGLVGMFDPK GRKVPVGLSIGIERIFSILEQRVEAEEKIRTETQVLVASAQKKLLEER LKLISELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEDTGIPPLVAIVGEQL KDGVVKLRRVATGEEVNIRRESLVEEIRRRTNQL	23
<i>Danio rerio</i>	MAALGLVSMRLCAGLMGRSAVRLHSLRVCSGMTISQIDEEVARLL QLKAQLGGDEGKHVFLKTAKGTRDYNPKQMAIREKVFNIIINCFK RHGAETIDSPVFELKETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLT VPFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDI AGQYDAMIPDAECLKLVYEILSELDLGDFRIKVNDRRILDGMFAICG VPDEKFRITCSTVDKLDKLAWEVKKEMVNEKGLSEEVADRIRDYV SMQGGKDLAERLLQDPKLSQSKQACAGITDMKLLFSYLELFQITDK VVFDSLARGLDYYTGVIYEAILTQANPAPASTPAEQNGAEDAGVSV GSVAGGGRYDGLVGMFDPKAGKCPVWGSALALRGSSPSWSRRQSC LQRRCAPLKLKCLWLQHRRTF	24

Por consiguiente, en cualquiera de los procedimientos, composiciones terapéuticas y kits de la presente descripción, las expresiones «**polipéptido de HRS**» «**proteína de HRS**» o «**fragmento de proteína de HRS**» incluyen todas las formas de origen natural y sintéticas de la histidil-ARNt sintetasa que posee una actividad no canónica, tal como una actividad antiinflamatoria y/o conserva al menos un epítipo que reacciona específicamente de forma cruzada con un autoanticuerpo o un linfocito T autorreactivo de un sujeto con una enfermedad asociada con autoanticuerpos para histidil-ARNt sintetasa. Dichos polipéptidos de HRS incluyen la proteína humana de longitud completa, así como los péptidos de HRS derivados de la proteína de longitud completa enumerados en las **tablas D1, D3-D6 o D8**. En algunas realizaciones de la presente descripción, la expresión polipéptido de HRS se refiere a una secuencia polipeptídica derivada de histidil-ARNt sintetasa humana (SEQ ID NO:1 en la **tabla D1**) de aproximadamente 45 o 50 a aproximadamente 250 aminoácidos de longitud. Se apreciará que, en cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento, el ácido N-terminal del polipéptido de HRS (por ejemplo, el Met N-terminal) se puede eliminar de cualquiera de las secuencias enumeradas en las **tablas D1, D3-D6 o D8** cuando se crea la proteína de fusión o el conjugado.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS está entre aproximadamente 20-509, 20-508, 20-507, 50-506, 20-505, 50-504, 20-503, 20-502, 20-501, 20-500, 20-400, 20-300, 20-250, 20-200 o 20-100 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, en realizaciones específicas de la presente descripción, el polipéptido está entre aproximadamente 20-25, 20-35, 20-40, 20-45, 20-55, 20-60, 20-65, 20-70, 20-75, 20-80, 20-85, 20-90, 20-95 o 20-100 aminoácidos de longitud, o aproximadamente 30-35, 30-40, 30-45, 30-55, 30-60, 30-65, 30-70, 30-75, 30-80, 30-85, 30-90, 30-95 o 30-100 aminoácidos de longitud, o aproximadamente 40-45, 40-55, 40-60, 40-65, 40-70, 40-75, 40-80, 40-85, 40-90, 40-95 o 40-100 aminoácidos de longitud, o aproximadamente 45-50, 45-55, 50-55, 50-60,

- 50-65, 50-70, 50-75, 50-80, 50-85, 50-90, 50-95 o 50-100 aminoácidos de longitud, o aproximadamente 60-65, 60-70, 60-75, 60-80, 60-85, 60-90, 60-95 o 60-100 aminoácidos de longitud, o aproximadamente 70-75, 70-80, 70-85, 70-90, 70-95 o 70-100 aminoácidos de longitud, o aproximadamente 80-85, 80-90, 80-95 u 80-100 aminoácidos de longitud. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38., 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508 o 509 aminoácidos de longitud.
- 10 En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS no compite significativamente por la unión del autoanticuerpo asociado a la enfermedad (por ejemplo, anticuerpo Jo-1) a la histidil-ARNt sintetasa de tipo silvestre en un ELISA competitivo hasta una concentración de aproximadamente $1 \text{ a } 5 \times 10^{-7} \text{ M}$, o superior. Por consiguiente, en algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una afinidad más baja por el autoanticuerpo asociado a la enfermedad que la histidil-ARNt sintetasa de tipo silvestre (SEQ ID NO:1) de acuerdo con se mide en un ELISA competitivo. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una afinidad aparente por el autoanticuerpo asociado a la enfermedad (por ejemplo, el anticuerpo Jo-1) que es al menos aproximadamente 10 veces menos, o al menos aproximadamente 20 veces menos, o al menos aproximadamente 50 veces menos, o al menos aproximadamente 100 veces menos que la afinidad del autoanticuerpo asociado a la enfermedad por el ser humano de tipo silvestre (SEQ ID NO:1).
- 20 Por lo tanto, todos dichos homólogos, ortólogos e isoformas de origen natural o sintéticas de histidil-ARNt sintetasa (por ejemplo, cualquiera de las proteínas enumeradas en las **tablas D1, D3-D6 o D8**) se incluyen en cualquiera de los procedimientos, conjugados HRS-Fc, kits y composiciones de la presente descripción, siempre que conserven al menos un epítipo que reacciona específicamente de forma cruzada con un autoanticuerpo o linfocito T autorreactivo de un sujeto con una enfermedad asociada con autoanticuerpos para histidil ARNt sintetasa, o posea una actividad no canónica. Los polipéptidos de HRS pueden estar en su forma nativa, es decir, como diferentes variantes tal como aparecen en la naturaleza en diferentes especies que pueden verse como variantes funcionalmente equivalentes de histidil-ARNt sintetasa humana, o pueden ser sus derivados naturales funcionalmente equivalentes, que pueden diferir en su secuencia de aminoácidos, por ejemplo, por truncamiento (por ejemplo, desde el extremo N o C o ambos) u otras eliminaciones, adiciones, inserciones, sustituciones o modificaciones postraduccionales de aminoácidos. Los derivados químicos de origen natural, incluyendo modificaciones postraduccionales y productos de degradación de cualquier polipéptido de HRS, también se incluyen específicamente en cualquiera de los procedimientos y composiciones de la presente descripción, que incluyen, por ejemplo, piroglutamilo, isoaspartilo, variantes proteolíticas, fosforiladas, glucosiladas, oxidadas, isomerizadas y desaminadas de un polipéptido de HRS o conjugado HRS-Fc. Los polipéptidos de HRS y los conjugados HRS-Fc también pueden estar compuestos por aminoácidos de origen natural y/o aminoácidos de origen no natural, como se describe en el presente documento.
- Como se ha señalado anteriormente, las realizaciones de la presente descripción incluyen todos los homólogos, ortólogos e isoformas de origen natural de histidil-ARNt sintetasa (por ejemplo, cualquiera de las proteínas enumeradas en o derivables de, o sus correspondientes ácidos nucleicos enumerados en, las tablas o la lista de secuencias) y «variantes» de estos polipéptidos de HRS de referencia. La mención «variante» polipeptídica se refiere a polipéptidos que se distinguen de un polipéptido de HRS de referencia por la adición, eliminación y/o sustitución de al menos un residuo de aminoácido, y que típicamente conservan (por ejemplo, imitan) o modulan (por ejemplo, antagonizan) una o más actividades no canónicas de un polipéptido de HRS de referencia. Las variantes también incluyen polipéptidos que se han modificado mediante la adición, eliminación y/o sustitución de al menos un residuo de aminoácido para tener una estabilidad mejorada u otras propiedades farmacéuticas.
- En ciertas realizaciones de la presente descripción, una variante polipeptídica se distingue de un polipéptido de referencia por una o más sustituciones, que pueden ser conservativas o no conservativas, como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la variante polipeptídica comprende sustituciones conservativas y, a este respecto, se entiende bien en la técnica que algunos aminoácidos pueden cambiarse a otros con propiedades ampliamente similares sin cambiar la naturaleza de la actividad del polipéptido. En algunas realizaciones de la presente descripción, la variante comprende uno o más residuos conservados, incluyendo uno o más de Leu7, Gln14, Gly15, Val18, Arg19, Leu21, Lys22, Lys25, Ala26, Val35, Leu38, Leu39, Leu41 y Lys 42 (basándose en la numeración de la SEQ ID NO:1).
- Los ejemplos específicos de variantes de polipéptidos de HRS útiles en cualquiera de los procedimientos y composiciones de la presente descripción incluyen polipéptidos de HRS de longitud completa, o truncamientos o variantes de *splicing* de los mismos (por ejemplo, cualquiera de las proteínas enumeradas o derivables de las tablas o la lista de secuencias) que i) conservan la actividad no canónica detectable y/o conservan al menos un epítipo que

reacciona específicamente de forma cruzada con un autoanticuerpo o linfocito T autorreactivo de un sujeto con una enfermedad asociada con autoanticuerpos para histidil-ARNt sintetasa, y ii) tienen una o más inserciones, sustituciones, eliminaciones y/o truncamientos de aminoácidos adicionales. En ciertas realizaciones de la presente descripción, un polipéptido variante incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o más de identidad o similitud de secuencia con una secuencia correspondiente de un polipéptido de HRS de referencia, como se describe en el presente documento (por ejemplo, cualquiera de las proteínas enumeradas en o derivables de las tablas o la lista de secuencias) y conserva sustancialmente la actividad no canónica de ese polipéptido de referencia. También se incluyen secuencias que difieren de las secuencias de HRS de referencia por la adición, eliminación o sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16., 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 o más aminoácidos, pero que conservan las propiedades del polipéptido de HRS de referencia. En ciertas realizaciones de la presente descripción, las adiciones o eliminaciones de aminoácidos se producen en el extremo C-terminal y/o el extremo N-terminal del polipéptido de HRS de referencia. En ciertas realizaciones de la presente descripción, las adiciones de aminoácidos incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más residuos de tipo silvestre (es decir, del polipéptido de HRS de longitud completa correspondiente) que están próximos al extremo C-terminal y/o al extremo N-terminal del polipéptido de HRS de referencia.

En algunas realizaciones de la presente descripción, los polipéptidos de HRS comprenden un fragmento polipeptídico de la histidil ARNt sintetasa de longitud completa de aproximadamente 45 a 250 o aproximadamente 50 a 250 aminoácidos, que comprende, consiste o consiste esencialmente en los aminoácidos de la secuencia de polipéptido de HRS expuesta en una o más de las SEQ ID NO:1-106, 170-181 o 185-191. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende, consiste o consiste esencialmente en los residuos 1-141, 1-408, 1-113 o 1-60 de la SEQ ID NO:1. En algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS es una variante de splicing que comprende, consiste o consiste esencialmente en los residuos 1-60+175-509, 1-60+211-509 o 1-60+101-509 de la SEQ ID NO:1. En aspectos particulares de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende, consiste o consiste esencialmente en los residuos 1-48 o 1-506 de la SEQ ID NO:1.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, un polipéptido de HRS comprende, consiste o consiste esencialmente en el fragmento activo mínimo de un polipéptido de HRS de longitud completa capaz de modular una actividad antiinflamatoria *in vivo* o que tiene actividades de bloqueo de anticuerpos o linfocitos T autorreactivos. En un aspecto de la presente descripción, dicho fragmento activo mínimo comprende, consiste o consiste esencialmente en el dominio WHEP (es decir, aproximadamente los aminoácidos 1-43 de la SEQ ID NO:1). En algunos aspectos de la presente descripción, el fragmento activo mínimo comprende, consiste o consiste esencialmente en el dominio de aminoacilación (es decir, aproximadamente los aminoácidos 54-398 de la SEQ ID NO:1). En algunos aspectos de la presente descripción, el fragmento activo mínimo comprende, consiste o consiste esencialmente en el dominio de unión anticodón (es decir, aproximadamente los aminoácidos 406-501 de la SEQ ID NO:1). Otros fragmentos activos ejemplares se muestran en la **tabla D4** a continuación.

Tabla D4 Fragmentos de polipéptido de HRS ejemplares			
Nombre	Intervalo de residuos de aminoácidos de la SEQ ID N O:1	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
HRS(1-500)	Proteína/ Humana/ 1-500	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVF DVII RCFKRHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGE QELKDGVIKLSVTSREEVDVRREDL VEEIKR	170
HRS(1-501)	Proteína/ Humana/ 1-501	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVF DVII RCFKRHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGE QELKDGVIKLSVTSREEVDVRREDL VEEIKRR	171
HRS(1-502)	Proteína/ Humana/ 1-502	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVF DVII RCFKRHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGE QELKDGVIKLSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRT	172

HRS(1-503)	Proteína/ Humana/ 1-503	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTETQVL VASAQKLLLEERLKLVSSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTG	173
HRS(1-504)	Proteína/ Humana/ 1-504	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTETQVL VASAQKLLLEERLKLVSSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQ	174
HRS(1-505)	Proteína/ Humana/ 1-505	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSONKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTETQVL VASAQKLLLEERLKLVSSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQP	175
HisRS1 ^{N8} HRS(1-506)	Proteína/ Humana/ 1-506	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTETQVL VASAQKLLLEERLKLVSSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPL	25

HRS(1-507)	Proteína/ Humana/ 1-507	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPLC	176
HRS(1-508)	Proteína/ Humana/ 1-508	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPLCI	177
HRS(1-509)	Proteína/ Humana/ 1-509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPLCIC	178
HisRS1 ^{N6} HRS(1-48)	Proteína/ Humana/ 1-48	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPD	26

Para algunos polipéptidos de HRS, aproximadamente o al menos aproximadamente 20-40, 20-45, 20-50, 20-55, o 20-60, 20-65, o 20-67 aminoácidos contiguos o no contiguos del polipéptido de HRS son de los aminoácidos 1-67 de la SEQ ID NO:1. En realizaciones particulares de la presente descripción, aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66 o 67 aminoácidos contiguos o no contiguos del polipéptido de HRS son de los aminoácidos 1-67 de la SEQ ID NO:1. El polipéptido de HRS puede comprender uno o más de un dominio WHEP, un dominio de aminoacilación, un dominio de unión anticodón, o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones particulares de la presente descripción, el polipéptido de HRS carece de un dominio de aminoacilación funcional. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido consiste esencialmente en el dominio WHEP de HRS humana. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, la orientación o conformación única del dominio WHEP en ciertos polipéptidos de HRS puede contribuir a las actividades mejoradas no canónicas y/o de bloqueo de anticuerpos observadas en estas proteínas.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de dominio WHEP de HRS humana. En algunas realizaciones de la presente descripción, la secuencia del dominio WHEP de HRS humana está definida por ciertos residuos conservados. Por ejemplo, en algunos aspectos de la presente descripción, el polipéptido de HRS comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de consenso del dominio WHEP de HRS humana en la **tabla D5** a continuación.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, o todos los 29 aminoácidos de un enlazador flexible que conecta el dominio mínimo a una proteína heteróloga (por ejemplo, dominio Fc), o variante de *splicing*.

Las menciones «identidad de secuencia» o, por ejemplo, que comprende una «secuencia 50 % idéntica a», como se usan en el presente documento, se refieren al grado en que las secuencias son idénticas nucleótido por nucleótido o aminoácido por aminoácido en una ventana de comparación. Por lo tanto, un «porcentaje de identidad de secuencia» se puede calcular comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las cuales la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) se produce en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

Las expresiones usadas para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polipéptidos incluyen «secuencia de referencia», «ventana de comparación», «identidad de secuencia», «porcentaje de identidad de secuencia» e «identidad sustancial». Una «secuencia de referencia» tiene al menos 12 pero con frecuencia de 15 a 18 y a menudo al menos 25 unidades monoméricas, incluyendo nucleótidos y residuos de aminoácidos, de longitud. Debido a que dos polipéptidos pueden comprender, cada uno, (1) una secuencia (es decir, solo una parte de la secuencia polipeptídica completa) que es similar entre los dos polipéptidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polipéptidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polipéptidos se realizan típicamente comparando secuencias de los dos polipéptidos en una «ventana de comparación» para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una «ventana de comparación» se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 donde se compara una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que la dos secuencias están alineadas de manera óptima. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) de aproximadamente el 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en la versión 7.0 del paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE. UU.) o por inspección y el mejor alineamiento (es decir, que da como resultado el porcentaje más alto de homología en la ventana de comparación) generado por cualquiera de los diversos procedimientos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST como se divulga, por ejemplo, por Altschul *y col.*, 1997, *Nucl. Acids Res.* 25: 3389. Una discusión detallada del análisis de secuencias se puede encontrar en la Unidad 19.3 del documento Ausubel *y col.*, «Current Protocols in Molecular Biology», John Wiley & Sons Inc., 1994-1998, Capítulo 15.

Los cálculos de similitud de secuencia o identidad de secuencia entre secuencias (los términos se usan de manera intercambiable en el presente documento) se pueden realizar de la siguiente manera. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias pueden alinearse para fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico para un alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas se pueden ignorar con fines de comparación). En ciertas realizaciones de la presente descripción, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines de comparación es al menos el 30 %, preferentemente al menos el 40 %, más preferentemente al menos el 50 %, 60 %, e incluso más preferentemente al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. A continuación se comparan los residuos de aminoácidos o los nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición.

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

5

La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden conseguir usando un algoritmo matemático. En una realización preferida de la presente descripción, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch, (1970, *J. Mol. Biol.* 48: 444-453) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En otra realización preferida de la presente descripción, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 o 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Un conjunto de parámetros particularmente preferido (y el que debe usarse a menos que se especifique lo contrario) es una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización de hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4 y una penalización de hueco por desplazamiento del marco de 5. El porcentaje de identidad entre dos secuencias aminoácidos o nucleótidos también se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (1989, *Cabios*, 4: 11-17) que se incorporó al programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

20

Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas descritas en el presente documento pueden usarse como una «secuencia de consulta» para realizar una búsqueda en bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden realizar usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, y col., (1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-10). Las búsquedas de nucleótidos en BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la presente descripción. Las búsquedas de proteínas en BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas de la presente descripción. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, puede usarse Gapped BLAST como se describe en Altschul y col. (*Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

En ciertas realizaciones de la presente descripción, los polipéptidos variantes difieren de las secuencias de referencia de HRS correspondientes en al menos un 1 % pero menos del 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de los residuos. Si esta comparación requiere alineamiento, las secuencias deben alinearse para una máxima similitud. Las secuencias «en bucle» de las eliminaciones o inserciones, o faltas de correspondencia, se consideran diferencias. Las diferencias son, adecuadamente, diferencias o cambios en un residuo no esencial o una sustitución conservativa. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el peso molecular de un polipéptido de HRS variante difiere del peso del polipéptido de HRS de referencia en aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 % o más.

También se incluyen «fragmentos» biológicamente activos de los polipéptidos de HRS de referencia, es decir, fragmentos biológicamente activos de los fragmentos de proteína de HRS. Los fragmentos representativos biológicamente activos generalmente participan en una interacción, por ejemplo, una interacción intramolecular o intermolecular. Una interacción intermolecular puede ser una interacción de unión específica o una interacción enzimática. Una interacción intermolecular puede ser entre un polipéptido de HRS y un socio de unión celular, tal como un receptor celular u otra molécula huésped que participa en la actividad no canónica del polipéptido de HRS.

Un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de HRS de referencia puede ser un fragmento polipeptídico que tiene, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 38, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 380, 400, 450, 500, 505, o más aminoácidos contiguos o no contiguos, incluyendo todos los números enteros (por ejemplo, 101, 102, 103) e intervalos (por ejemplo, 50-100, 50-150, 50-200) intermedios, de las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de los polipéptidos de HRS de referencia descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones de la presente descripción, un fragmento biológicamente activo comprende una secuencia, dominio o motivo relacionado con la actividad no canónica. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la región C-terminal o N-terminal de cualquier polipéptido de HRS de referencia puede truncarse en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120,

130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o más aminoácidos, o en aproximadamente 10-50, 20-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500 o más aminoácidos, incluyendo todos los números enteros e intervalos intermedios (por ejemplo, 101, 102, 103, 104, 105), siempre que el polipéptido de HRS truncado conserve la actividad no canónica del polipéptido de referencia. Ciertos 5 polipéptidos de HRS truncados ejemplares y una secuencia de consenso del dominio WHEP de HRS humana se muestran en la **tabla D5** a continuación.

Tabla D5		
Polipéptidos de HRS truncados ejemplares		
Truncamientos C-terminales		
Intervalo de HRS	Secuencia	SEQ ID NO:
1-80	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	27
1-79	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDV	28
1-78	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVF	29
1-77	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVF	30
1-76	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKV	31
1-75	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREK	32
1-74	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVRE	33
1-73	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVR	34
1-72	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAV	35
1-71	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMA	36
1-70	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQM	37
1-69	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQ	38
1-68	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSR	39
1-67	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS	40
1-66	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS	41
1-65	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDY	42
1-64	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRD	43
1-63	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTR	44

1-62	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGT	45
1-61	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKG	46
1-60	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPK	47
1-59	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTP	48
1-58	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKT	49
1-57	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLK	50
1-56	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVL	51
1-55	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFV	52
1-54	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKF	53
1-53	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQK	54
1-52	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQ	55
1-51	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESK	56
1-50	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDES	57
1-49	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDE	58
1-48	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLGPD	59
1-47	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLGP	60
1-46	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLG	61
1-45	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQL	62
1-44	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQ	63
1-43	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKA	64
1-42	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LK	65
1-41	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK L	66
1-40	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK	67
Truncamientos N-terminales		
2-80	AERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVI	68
3-80	ERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVI	69
4-80	RAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVI	70

5-80	AALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	71
6-80	ALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	72
7-80	LEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	73
8-80	EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	74
9-80	ELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	75
10-80	LVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	76
11-80	VKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	77
12-80	KLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	78
13-80	LQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	79
14-80	QGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	80
15-80	GERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	81
16-80	RVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	82
17-80	VRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	83
18-80	RGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	84
19-80	GLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	85
20-80	LKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	86
21-80	KQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	87
22-80	QQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	88
23-80	QKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	89
24-80	KASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	90
25-80	ASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	91
26-80	SAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	92

27-80	AELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	93
28-80	ELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	94
29-80	LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	95
30-80	IEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	96
31-80	EEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	97
32-80	EEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	98
33-80	EVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	99
34-80	VAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	100
35-80	AKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	101
36-80	KLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	102
37-80	LLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	103
38-80	LKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	104
39-80	KLKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	105
40-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDDVI	106
Consenso de WHEP de HRS	X _A -L-X _B -Q-G-X-X-V-R-X-L-K-X-X-K-A-X _C -V-X-X-L-L-X-L-K-X _D donde X es cualquier aminoácido X _A es 0-50 aminoácidos X _B es aproximadamente 5-7 aminoácidos, preferentemente 6 aminoácidos X _C es aproximadamente 7-9 aminoácidos, preferentemente 8 aminoácidos X _D es 0-50 aminoácidos	322

Se apreciará que, en cualquiera de los conjugados HRS-Fc de la presente descripción, el ácido N-terminal del polipéptido de HRS (por ejemplo, el Met N-terminal) puede eliminarse adicionalmente de cualquiera de los polipéptidos de HRS truncados ejemplares u otras secuencias de HRS descritas en el presente documento.

5

Típicamente, el fragmento biológicamente activo tiene no menos de aproximadamente el 1 %, 10 %, 25 % o 50 % de una actividad del polipéptido de HRS de referencia biológicamente activo (es decir, actividad no canónica) del cual se deriva. Los procedimientos ejemplares para medir dichas actividades no canónicas se describen en los ejemplos.

- 10 En algunas realizaciones de la presente descripción, las proteínas de HRS, variantes y fragmentos biológicamente activos de las mismas, se unen a uno o más socios de unión celular con una afinidad de al menos aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 100 o 150 nM. En algunas realizaciones de la presente descripción, la afinidad de unión de un fragmento de proteína de HRS por un socio de unión celular seleccionado, particularmente
- 15 un socio de unión que participa en una actividad no canónica, puede ser más fuerte que la del polipéptido de HRS de longitud completa correspondiente o una variante del polipéptido de HRS sometida a splicing de forma alternativa, en al menos aproximadamente 1,5x, 2x, 2,5x, 3x, 3,5x, 4x, 4,5x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x, 20x, 25x, 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, 200x, 300x, 400x, 500x, 600x, 700x, 800x, 900x, 1000x o más (incluyendo todos los números enteros intermedios).

20

Como se ha señalado anteriormente, un polipéptido de HRS puede alterarse de diversas maneras, incluyendo las sustituciones, eliminaciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los procedimientos para dichas manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de HRS de referencia se pueden preparar mediante mutaciones en el ADN. Los

25 procedimientos para la mutagenia y las alteraciones de la secuencia de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 82: 488-492), Kunkel y col., (1987, *Methods in Enzymol.* 154: 367-382), Patente de Estados Unidos N.º 4.873.192, Watson, J. D. y col., («Molecular Biology of the Gene», Cuarta Edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, California, 1987) y las referencias citadas

en el mismo. En el modelo de Dayhoff y col., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC) se puede encontrar orientación sobre las sustituciones apropiadas de aminoácidos que no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés.

- 5 Los polipéptidos de HRS truncados y/o variantes biológicamente activos pueden contener sustituciones de aminoácidos conservativas en diversas ubicaciones a lo largo de su secuencia, en comparación con un residuo de aminoácido de HRS de referencia, y dichas sustituciones adicionales pueden mejorar aún más la actividad o estabilidad de los polipéptidos de HRS con un contenido de cisteína alterado. Una «sustitución de aminoácidos conservativa» es aquella donde el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una
- 10 cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, que en general se pueden subdividir de la siguiente manera:

Ácidos: el residuo tiene una carga negativa debido a la pérdida de iones H a pH fisiológico y el residuo es atraído por una solución acuosa para buscar las posiciones superficiales en la conformación de un péptido donde está contenido

15 cuando el péptido está en medio acuoso a pH fisiológico. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral ácida incluyen ácido glutámico y ácido aspártico.

Básicos: el residuo tiene una carga positiva debido a la asociación con el ion H a pH fisiológico o dentro de una o dos unidades de pH del mismo (por ejemplo, histidina) y el residuo es atraído por una solución acuosa para buscar

20 las posiciones superficiales en la conformación de un péptido donde está contenido cuando el péptido está en medio acuoso a pH fisiológico. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral básica incluyen arginina, lisina e histidina.

Cargados: los residuos están cargados a pH fisiológico y, por lo tanto, incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas o básicas (es decir, ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina e histidina).

55 Hidrófobos: los residuos no están cargados a pH fisiológico y el residuo es repelido por una solución acuosa para buscar las posiciones internas en la conformación de un péptido donde está contenido cuando el péptido está en un medio acuoso. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba incluyen tirosina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina y triptófano.

30 Neutros/polares: los residuos no están cargados a pH fisiológico, pero el residuo no es repelido lo suficiente por las soluciones acuosas de modo que buscara posiciones internas en la conformación de un péptido donde está contenido cuando el péptido está en un medio acuoso. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra/polar incluyen asparagina, glutamina, cisteína, histidina, serina y treonina.

35 Esta descripción también caracteriza a ciertos aminoácidos como «pequeños», ya que sus cadenas laterales no son lo suficientemente grandes, incluso si faltan grupos polares, para conferir hidrofobicidad. Con la excepción de la prolina, los aminoácidos «pequeños» son aquellos con cuatro carbonos o menos cuando al menos un grupo polar está en la cadena lateral y tres carbonos o menos cuando no lo está. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral

40 pequeña incluyen glicina, serina, alanina y treonina. El aminoácido secundario codificado por el gen, prolina, es un caso especial debido a sus efectos conocidos sobre la conformación secundaria de las cadenas peptídicas. La estructura de la prolina difiere de todos los otros aminoácidos naturales en que su cadena lateral está unida al nitrógeno del grupo α -amino, así como al carbono α . Se conocen varias matrices de similitud de aminoácidos en la técnica (véase, por ejemplo, matriz PAM120 y matriz PAM250 como es divulgado, por ejemplo, por Dayhoff y col.,

45 1978, A model of evolutionary change in proteins). Matrices para determinar relaciones de distancia En M. O. Dayhoff, (ed.), Atlas of protein sequence and structure, Vol. 5, págs. 345-358, National Biomedical Research Foundation, Washington DC; y por Gonnet y col., (*Science*, 256: 14430-1445, 1992), sin embargo, incluyen la prolina en el mismo grupo que la glicina, la serina, la alanina y la treonina. Por consiguiente, para los fines de la presente descripción, la prolina se clasifica como un aminoácido «pequeño».

50 El grado de atracción o repulsión requerido para la clasificación como polar o no polar es arbitrario y, por lo tanto, los aminoácidos específicamente contemplados por la presente descripción se han clasificado como uno u otro. La mayoría de los aminoácidos que no se mencionan específicamente pueden clasificarse basándose en el comportamiento conocido.

55 Los residuos de aminoácidos pueden ser subclasificados como clasificaciones autoexplicativas, cíclicas o no cíclicas, y aromáticas o no aromáticas, con respecto a los grupos sustituyentes de cadena lateral de los residuos, y como pequeños o grandes. El residuo se considera pequeño si contiene un total de cuatro átomos de carbono o menos, incluido el carbono del carboxilo, siempre que esté presente un sustituyente polar adicional; tres o menos si

60 no. Los residuos pequeños siempre son, por supuesto, no aromáticos. Dependiendo de sus propiedades

estructurales, los residuos de aminoácidos pueden estar en dos o más clases. Para los aminoácidos de proteínas naturales, la subclasificación de acuerdo con este esquema se presenta en la **tabla A**.

Tabla A: subclasificación de aminoácidos.

Subclases	Aminoácidos
Ácidos	Ácido aspártico, ácido glutámico
Básicos	No cíclicos: arginina, lisina; Cíclicos: histidina
Cargados	Ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina, histidina
Pequeños	Glicina, serina, alanina, treonina, prolina
Polares/neutros	Asparagina, histidina, glutamina, cisteína, serina, treonina
Polares/grandes	Asparagina, glutamina
Hidrófobos	Tirosina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano
Aromáticos	Triptófano, tirosina, fenilalanina
Residuos que influyen en la orientación de la cadena.	Glicina y prolina

5

La sustitución de aminoácidos conservativa también incluye agrupaciones basadas en cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Por ejemplo, es razonable esperar que el reemplazo de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente no tenga un efecto considerable sobre las propiedades del polipéptido variante resultante. Si un cambio de aminoácido da como resultado un polipéptido de HRS truncado y/o variante funcional, se puede determinar fácilmente mediante el ensayo de su actividad no canónica, como se describe en el presente documento. Las sustituciones conservativas se muestran en la tabla B bajo el encabezado de sustituciones ejemplares. Las sustituciones de aminoácidos que están dentro del alcance de la presente descripción, se realizan, en general, seleccionando sustituciones que no difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto peptídico en el área de la sustitución, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, (c) la mayor parte de la cadena lateral, o (d) la función biológica. Después de que se introducen las sustituciones, las variantes se examinan para determinar la actividad biológica.

10

Tabla B: sustituciones ejemplares de aminoácidos.

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala, Leu, Val	Ser, Ala
Gln	Asn, His, Lys,	Asn
Glu	Asp, Lys	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleu	Leu
Leu	Norleu, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Ile, Phe	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleu	Leu

25

Como alternativa, los aminoácidos similares para realizar sustituciones conservativas pueden agruparse en tres

categorías basándose en la identidad de las cadenas laterales. El primer grupo incluye ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina, histidina, que tienen todas cadenas laterales cargadas; el segundo grupo incluye glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, glutamina, asparagina; y el tercer grupo incluye leucina, isoleucina, valina, alanina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, como se describe en Zubay, G., *Biochemistry*, tercera edición, Wm.C. Brown Publishers (1993).

La estructura de RMN del dominio WHEP de HRS humana se ha determinado (véase Nameki y col., Acceso 1X59_A). Además, también se han determinado las estructuras cristalinas de HRS humana de longitud completa y un mutante de eliminación del dominio catalítico interno de HRS (HRSΔCD) (véase Xu y col., *Structure*. 20: 1470-7, 2012; y la solicitud de Estados Unidos N.º 61/674.639). Junto con la secuencia de aminoácidos primaria de HRS, estas descripciones físicas detalladas de la proteína proporcionan información precisa sobre los papeles desempeñados por aminoácidos específicos dentro de la proteína. Los expertos en la materia pueden usar esta información para identificar dominios conservados estructuralmente, regiones de enlace, estructuras secundarias tales como hélices alfa, aminoácidos superficiales o expuestos por disolvente, regiones internas o no expuestas, sitios catalíticos y superficies de interacción con ligandos, entre otras características estructurales. Dichos expertos pueden usar esa y otra información para diseñar fácilmente variantes de HRS que conservan o mejoran la actividad no canónica de interés, por ejemplo, conservando o alterando las características de los residuos de aminoácidos dentro o adyacentes a estas y otras características estructurales, tal como por ejemplo conservando o alterando la polaridad, el índice de hidropatía, la carga, el tamaño y/o el posicionamiento (es decir, hacia adentro, hacia afuera) de la o las cadenas laterales de aminoácidos seleccionadas con respecto a los residuos de tipo silvestre (véase, por ejemplo, Zaiwara y col., *Mol Biotechnol*. 51:67-102, 2012; Perona y Hadd, *Biochemistry*. 51:8705-29, 2012; Morin y col., *Trends Biotechnol*. 29:159-66, 2011; Collins y col., *Annu. Rev. Biophys.* 40:81-98, 2011; y solicitud de Estados Unidos N.º 61/674.639).

Por lo tanto, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un polipéptido de HRS truncado y/o variante se reemplaza típicamente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Como alternativa, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de HRS, tal como mediante mutagenia de saturación, y los mutantes resultantes pueden seleccionarse para una actividad del polipéptido parental para identificar mutantes que conservan esa actividad. Después de la mutagenia de las secuencias codificantes, el péptido codificado se puede expresar de forma recombinante y se puede determinar la actividad del péptido. Un residuo de aminoácido «no esencial» es un residuo que se puede alterar de la secuencia de referencia de un polipéptido de realización sin suprimir o alterar sustancialmente una o más de sus actividades no canónicas. Adecuadamente, la alteración no suprime sustancialmente una de estas actividades, por ejemplo, la actividad es al menos un 20 %, 40 %, 60 %, 70 % o 80 % 100 %, 500 %, 1000 % o más de la secuencia de HRS de referencia. Un residuo de aminoácido «esencial» es un residuo que, cuando se modifica a partir de la secuencia de referencia de un polipéptido de HRS, da como resultado la supresión de una actividad de la molécula parental de manera que menos del 20 % de la actividad de referencia está presente. Por ejemplo, dichos residuos de aminoácidos esenciales incluyen aquellos que se conservan en los polipéptidos de HRS a través de diferentes especies, incluyendo aquellas secuencias que se conservan en el o los sitios de unión activos o en el o los motivos de los polipéptidos de HRS de diversas fuentes.

Los ensayos para determinar la actividad antiinflamatoria, incluyendo las mediciones de rutina de la liberación de citocinas a partir de células *in vitro*, y los estudios en animales están bien establecidos en la técnica (véase, por ejemplo, Wittmann y col., *J Vis Exp*. (65):e4203. doi: 10.3791 / 4203, 2012; Feldman y col., *Mol Cell*. 47: 585-95, 2012; Clutterbuck y col., *J. Proteomics*. 74: 704-15, 2011, Giddings y Maitra, *J Biomol Screen*. 15: 1204-10, 2010; Wijnhoven y col., *Glycoconj J*. 25: 177-85, 2008; y Frow y col., *Med Res Rev*. 24: 276-98, 2004) y se pueden usar fácilmente para perfilar y optimizar la actividad antiinflamatoria. Un sistema experimental *in vivo* ejemplar también se describe en los ejemplos adjuntos.

En algunas realizaciones de la presente descripción, los polipéptidos de HRS pueden tener una o más sustituciones de cisteína, donde uno o más residuos de origen natural (no cisteína) están sustituidos con cisteína (por ejemplo, para alterar la estabilidad, para facilitar la conjugación basada en tiol de un fragmento Fc, para facilitar la unión a base de tiol de PEG u otras moléculas). En algunas realizaciones de la presente descripción, las sustituciones de cisteína están cerca del extremo N y/o el extremo C del polipéptido de HRS (por ejemplo, SEQ ID NOS:1-106, 170-181 o 185-191), u otras regiones expuestas en la superficie de un polipéptido de HRS. Las realizaciones particulares de la presente descripción incluyen cuando uno o más residuos dentro de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos en relación con el extremo N y/o el extremo C de cualquiera de las SEQ ID NOS:1-106, 170-181 o 185-191 están sustituidos con un residuo de cisteína. En algunas realizaciones de la presente descripción, pueden añadirse residuos de cisteína al polipéptido de HRS a través de la creación de proteínas de fusión N o C-terminales. Dichas proteínas de fusión pueden ser de cualquier longitud, pero

típicamente serán de aproximadamente 1-5, o aproximadamente de 5 a 10, de aproximadamente 10 a 20, o de aproximadamente 20 a 30 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones de la presente descripción, se prefiere la fusión al extremo C.

- 5 Realizaciones específicas ejemplares de la presente descripción de dichas proteínas modificadas con cisteína se muestran en la **tabla D6**, basándose en el polipéptido de HRS, HRS(1-60). Este enfoque es directamente aplicable a los polipéptidos de HRS de la tabla D5, y a otros polipéptidos de HRS descritos en el presente documento.

Tabla D6		
Nombre	Secuencias de proteínas	SEQ ID NO:
HRS(1-60)-M1MC-	<u>M</u> CAERAALEE LVKLQGERVR GLKQKQKASAE LIEEEVAKLL KLKAQLGPDE SKQKFLKTP K	179
HRS(1-60)-A26C-	MAERAALEEL VKLQGERVRG LKQKQ <u>C</u> SAEL IIEEVAKLLK LKAQLGPDES KQKFLKTPK	180
HRS(1-60)-C61	MAERAALEEL VKLQGERVRG LKQKQKASAE IIEEVAKLLK LKAQLGPDES KQKFLKTPK C	181
Secuencias de ADN		
HRS(1-60)-M1MC-	ATGTGTGCAGAAAGAGCCGCCCTGGAAGAGTTAGTTAAGTTGCAAGGT GAACGTGTCCGTGGTCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGAT CGAAGAAGAGGTGGCCAAACTGCTGAAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCC CGGACGAGAGCAAACAAAAGTTCGTCTCTGAAAACCCCGAAA	182
HRS(1-60)-A26C-	ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAAACTGCAAGGTGA ACGTGTTTCGTGGTCTGAAGCAGCAGAAGTGCAGCGCGGAGCTGATCGA AGAAGAGGTGGCCAAACTGCTGAAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCCGG ACGAGAGCAAACAAAAGTTCGTCTCTGAAAACCCCGAAA	183
HRS(1-60)-C61	ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAAACTGCAAGGTGA ACGTGTTTCGTGGTCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGATCGA AGAAGAGGTGGCCAAACTGCTGAAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCCGG ACGAGAGCAAACAAAAGTTCGTCTCTGAAAACCCCGAAATGC	184

- 10 En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido HRS puede incluir mutantes donde los residuos de cisteína endógenos o de origen natural se han mutado a aminoácidos alternativos, o se han eliminado. En algunas realizaciones de la presente descripción, la inserción o sustitución de uno o más residuos de cisteína en el polipéptido de HRS se puede combinar con la eliminación de otros residuos de cisteína reactivos expuestos en la superficie. Por consiguiente, en algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS puede
- 15 comprender una o más sustituciones y/o eliminaciones en Cys83, Cys174, Cys191, Cys196, Cys224, Cys235, Cys379, Cys455, Cys507 y/o Cys509 (como se define mediante la SEQ ID NO:1), por ejemplo, para eliminar los residuos de cisteína de origen natural.

- Las realizaciones específicas de la presente descripción incluyen cualquiera de las SEQ ID NOS:1-106, 170-181 o
- 20 185-191, o variantes o fragmentos de las mismas, que tienen en la mutación o eliminación de uno cualquiera o más de Cys83, Cys174, Cys191, Cys196, Cys224, Cys235, Cys379, Cys455, o la eliminación de Cys507 y Cys509, por ejemplo, mediante la eliminación de los 3 aminoácidos C-terminales (Δ 507-509). Las mutaciones ejemplares en estas posiciones incluyen, por ejemplo, la mutación de cisteína a serina, alanina, leucina, valina o glicina. En ciertas realizaciones de la presente descripción, los residuos de aminoácidos para sustituciones de cisteína específicas
- 25 pueden seleccionarse de sustituciones naturales que se encuentran en los ortólogos de HRS de otras especies y organismos. Las sustituciones ejemplares de este tipo se presentan en la **Tabla D7**.

Tabla D7

variación de secuencia de origen natural en posiciones ocupadas por residuos de cisteína en HRS humana

nº de residuo de cisteína de H. sapiens	P.troglodyte	M.mulatta	B.taurus	M.musculus	R.norvegicus	G.gallus	X.laevis	D.reio	D.melanogaster	C.elegans	S.cerevisiae	E.coli
83	C	C	C	C	C	C	C	C	V	T	L	V
174	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	L
191	C	C	C	C	C	C	C	C	C	V	C	A/L
196	C	C	C	C	C	Q	H	Y	S	M	V	L/A
224	C	C	C	C	C	C	C	C	C	S	A	A
235	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	S	E
379	C	C	C	C	C	C	C	V	C	C	C	A
455	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	A	A
507	C	R	C	S	S	-	-	-	-	S/Q	S/E	-
509	C	C	C	C	-	-	-	-	-	I	I/G	-

En algunas realizaciones de la presente descripción, las cisteínas de origen natural seleccionadas para la mutagenia se seleccionan basándose en su exposición en la superficie. Por consiguiente, en un aspecto de la presente descripción, los residuos de cisteína seleccionados para la sustitución se seleccionan de entre Cys224, Cys235, Cys507 y Cys509. En algunas realizaciones de la presente descripción, los últimos tres residuos (C-terminales) de la SEQ ID NO:1 se eliminan para eliminar los residuos 507 a 509. En algunas realizaciones de la presente descripción, las cisteínas se seleccionan para su mutación o eliminación para eliminar un par de cisteínas intramoleculares, por ejemplo Cys174 y Cys191.

- 10 Los ejemplos adicionales específicos de mutaciones/sustituciones de cisteína deseadas (indicadas en subrayado en negrita) para reducir los residuos de cisteína expuestos en la superficie incluydonde se enumeran a continuación en la **tabla D8**.

Tabla D8		
Polipéptidos de HRS con sustituciones para eliminar cisteínas expuestas en la superficie		
Nombre	Secuencia de proteína	SEQ ID NO:
HRS(1-506) C174A	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQKASAEIIEEVAKLLKLKAQLGPDESK QKFVLKTPKGTRDYSPROMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFELKETL MGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSRLYDLTPFARYLAMNKLTNIKRYHIAK VYRRDNPAMTRGRYREFYQ ADF DIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEVKNEMVGEK GLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEY LTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAG GRYDGLVGMFDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLV ASAQKLLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI IGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPL	185

HRS(1-506) C174V	MAERAAL ~~EEL~~ VKLQGERVRGLKQQKASAE ~~LIEEE~~ VAKLLKLKAQLGPDESK QKFVLKTPKGTRDYS ~~PRQ~~ MAVREKVFDV ~~IIR~~ CFKRHGAEVIDTPVFELKETL MGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLS ~~RYD~~ LTVPFARYLAMNKL ~~TN~~ IKRYHIAK VYRRDNPAMTRGRYREFYQ ~~V~~ DFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE ~~EV~~ KNEMVGEK GLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEY LTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAG GRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLV ASAQKKLLEERLKL ~~V~~ SELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI IGEQLKDGVIK ~~L~~ RSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPL	186
HRS(1-506) C191A	MAERAAL ~~EEL~~ VKLQGERVRGLKQQKASAE ~~LIEEE~~ VAKLLKLKAQLGPDESK QKFVLKTPKGTRDYS ~~PRQ~~ MAVREKVFDV ~~IIR~~ CFKRHGAEVIDTPVFELKETL MGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLS ~~RYD~~ LTVPFARYLAMNKL ~~TN~~ IKRYHIAK VYRRDNPAMTRGRYREFYQ ~~C~~ DFDIAGNFDPMIPDAE ~~A~~ LKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE ~~EV~~ KNEMVGEK GLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEY LTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAG GRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLV ASAQKKLLEERLKL ~~V~~ SELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI IGEQLKDGVIK ~~L~~ RSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPL	187
HRS(1-506) C191S	MAERAAL ~~EEL~~ VKLQGERVRGLKQQKASAE ~~LIEEE~~ VAKLLKLKAQLGPDESK QKFVLKTPKGTRDYS ~~PRQ~~ MAVREKVFDV ~~IIR~~ CFKRHGAEVIDTPVFELKETL MGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLS ~~RYD~~ LTVPFARYLAMNKL ~~TN~~ IKRYHIAK VYRRDNPAMTRGRYREFYQ ~~C~~ DFDIAGNFDPMIPDAE ~~S~~ LKIMCEILSSLQIGD LVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE ~~EV~~ KNEMVGEK LAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEY LTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAG RYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLV SAQKKLLEERLKL ~~V~~ SELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI GEQELKDGVIK ~~L~~ RSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPL	188
HRS(1-506) C191V	MAERAAL ~~EEL~~ VKLQGERVRGLKQQKASAE ~~LIEEE~~ VAKLLKLKAQLGPDESK QKFVLKTPKGTRDYS ~~PRQ~~ MAVREKVFDV ~~IIR~~ CFKRHGAEVIDTPVFELKETL MGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLS ~~RYD~~ LTVPFARYLAMNKL ~~TN~~ IKRYHIAK VYRRDNPAMTRGRYREFYQ ~~C~~ DFDIAGNFDPMIPDAE ~~V~~ LKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE ~~EV~~ KNEMVGEK GLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEY LTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAG GRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLV ASAQKKLLEERLKL ~~V~~ SELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI IGEQLKDGVIK ~~L~~ RSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPL	189
HRS(1-506) C224S	MAERAAL ~~EEL~~ VKLQGERVRGLKQQKASAE ~~LIEEE~~ VAKLLKLKAQLGPDESK QKFVLKTPKGTRDYS ~~PRQ~~ MAVREKVFDV ~~IIR~~ CFKRHGAEVIDTPVFELKETL MGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLS ~~RYD~~ LTVPFARYLAMNKL ~~TN~~ IKRYHIAK VYRRDNPAMTRGRYREFYQ ~~C~~ DFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAI ~~S~~ GVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE ~~EV~~ KNEMVGEK GLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEY LTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAG GRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLV ASAQKKLLEERLKL ~~V~~ SELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI IGEQLKDGVIK ~~L~~ RSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPL	190

HRS(1-506) C235S	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELEEEVAKLLKLKAQLGPDESK QKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAVIDTPVFELKETL MGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLNIKRYHIAK VYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTISSVDKLDKVSWEVKNEMVGEK GLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEY LTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVYIEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAG GRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLV ASAQKKLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI IGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPL	191
Nombres	Secuencias de ADN	SEQ ID NO:
HRS(1-506) C174A	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGAAC CGGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGAAGA AGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGATGAA AGTAAACAATAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTGATTATA GTCCACGTCAAATGGCCGTTCTGTGAAAAAGTGTTTCGACGTTATTATTCGC TGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGTATTTGAATT GAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAACTGATTTAT GATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCGCTACGACTTAA CTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaACCAACATCAAAC GTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACCCTGCAATGACTCGT GGACGCTATCGCGAATTCTATCAGGCTGATTTTGATATTGCCGGAAATTT CGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTTTGAAAATTATGTGTGAAATTC TGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTAAGTTAATGACCGCCGT ATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTGTTTCTGATTCCAAATTCCGT ACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGATAAAGTGTCTTGGAAGAAG TAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAGGCCTGGCTCCAGAAGTAGCAG ACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAACATGGCGGTGTGTCTTAGTCGAA CAGTTATTACAGGATCCTAAACTGAGCCAAAATAAACAAGCACTTGAAG GACTGGGAGATCTGAAATTACTCTTTGAATATCTGACCTTATTTGGGATT GATGATAAAATTAGCTTTGATCTGAGCTTGGCCCCGCGGTCTTGATTATTA TACCGGCGTGATTTACGAAGCTGTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGGCGG GCGAAGAGCCTTTGGGAGTCGGCAGTGTTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGA TGGTTTGGTAGGAATGTTTGACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTG GGGCTTTCTATCGGTGTCGAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTT GAAGCTTTGGAGGAAAAGATCCGTACCACGGAAaCCAAGTCTTAGTTGC aAGTGCCCAAAAAAACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAA CTTTGGGACGCCGGCATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAGAACCCGA AATTGTTAAACCAACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGT AGCTATTATTGGTGAGCAAGAATTAAGATGGCGTGATTAACTGCGT TCAGTAACAAGCCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTG AAGAAATTAAACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	192

HRS(1-506) C174V	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGAAC GCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGAAGA AGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGATGAA AGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTGATTATA GTCCACGTCAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTATTATTCGC TGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGTATTTGAATT GAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAAACTGATTTAT GATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCGCTACGACTTAA CTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaACCAACATCAAAC GTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACCCTGCAATGACTCGT GGAGCTATCGCGAATTCTATCAGGTTGATTTTGATATTGCCGGAATTT CGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTTTGAAAATTATGTGTGAAATTC TGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTAAGTTAATGACCGCCGT ATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTGTTTCTGATTCCAAATTCCGT ACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGATAAAGTGTCTTGGGAAGAAG TAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAGGCCTGGCTCCAGAAGTAGCAG ACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAACATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAA CAGTTATTACAGGATCCTAAACTGAGCCAAAATAAACAAGCACTTGAAG GACTGGGAGATCTGAAATTACTCTTTGAATATCTGACCTTATTTGGGATT GATGATAAAATTAGCTTTGATCTGAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTA TACCGGCGTGATTTACGAAGCTGTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGGCGG GCGAAGAGCCTTTGGGAGTCGGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGA TGGTTTGGTAGGAATGTTTGACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTG GGGCTTTCTATCGGTGTGGAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTT GAAGCTTTGGAGGAAAAGATCCGTACCACGGAaCCCAAGTCTTAGTTGC aAGTGCCCCAAAAAACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAA CTTTGGGACGCCGGCATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAGAACCCGA AATTGTTAAACCAACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGT AGCTATTATTGGTGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAAACTGCGT TCAGTAACAAGCCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGG AAGAAATTAAACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	193

HRS(1-506) C191A	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGAAC GCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGAAGA AGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGATGAA AGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTGATTATA GTCCACGTCAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTTCGACGTTATTATTCGC TGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGTATTTGAATT GAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAAACTGATTTAT GATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCGCTACGACTTAA CTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaACCAACATCAAAC GTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACCCTGCAATGACTCGT GGACCGTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGATATTGCCGGAAATTT CGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGGCTTTGAAAATTATGTGTGAATTT CTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTCTTGTAAGTTAATGACCGCCG TATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTGTTTCTGATTCCAAATTCCG TACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGATAAAGTGTCTTGGGAAGAA GTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAGGCCTGGCTCCAGAAGTAGCA GACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAACATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGA ACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGAGCCAAAATAAACAAGCACTTGAA GGACTGGGAGATCTGAAATTACTCTTTGAATATCTGACCTTATTTGGGAT TGATGATAAAATTAGCTTTGATCTGAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATT ATACCGGCGTGATTTACGAAGCTGTTCTCTTGCAAACCCAGCCCAGGCG GGCGAAGAGCCTTTGGGAGTCGGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATG ATGGTTTGGTAGGAATGTTTGACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGT GGGGCTTTCTATCGGTGTGCAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTC TTGAAGCTTTGGAGGAAAAGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTT GCaAGTGCCCAAAAAAAACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAG AACTTTGGGACGCCGGCATCAAGGCCGAACTGCTGTATAAAAAAGAACCC GAAATTGTTAAACCAACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCCTC GTAGCTATTATTGGTGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAAACTGC GTTCAAGTAACAAGCCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGT GGAAGAAATTAAACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	194

HRS(1-506) C191S	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGAAC GCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGAAGA AGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGATGAA AGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTGATTATA GTCCACGTCAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTTCGACGTTATTATTCGC TGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGTATTTGAATT GAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAAACTGATTTAT GATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCGCTACGACTTAA CTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaACCAACATCAAAC GTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACCCTGCAATGACTCGT GGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGATATTGCCGGAAATTT CGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGAGTTTGAAAATTATGTGTGAAATT CTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAAGTTAATGACCGCCG TATTTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTGTTTCTGATTCCAAATTCG TACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGATAAAGTGTCTTGGGAAGAA GTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAGGCCTGGCTCCAGAAGTAGCA GACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAACATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGA ACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGAGCCAAAATAAACAAGCACTTGAA GGACTGGGAGATCTGAAATTACTCTTTGAATATCTGACCTTATTTGGGAT TGATGATAAAATTAGCTTTGATCTGAGCTTGGCCCCGCGTCTTGATTATT ATACCGGCGTGATTTACGAAGCTGTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGGCG GGCGAAGAGCCTTTGGGAGTCGGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATG ATGGTTTGGTAGGAATGTTTGACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGT GGGGCTTTCTATCGGTGTGCAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTC TTGAAGCTTTGGAGGAAAAGATCCGTACCACGGAAaCCAAAGTCTTAGTT GCaAGTGCCCCAAAAAAACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAG AACTTTGGGACGCCGGCATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAGAACCC GAAATTGTTAAACCAACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCCTC GTAGCTATTATTGGTGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAACTGC GTTTCAGTAACAAGCCGTGAAGAGGTAGATGTACGTGCGGAAGACTTAGT GGAAGAAATTAAACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	195

HRS(1-506) C191V	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGAAC GCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGAAGA AGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGATGAA AGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTGATTATA GTCCACGTCAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTATTATTCGC TGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGTATTTGAATT GAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAAACTGATTTAT GATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCGCTACGACTTAA CTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaACCAACATCAAAC GTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACCCTGCAATGACTCGT GGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGATATTGCCGGAATTT CGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGGTTTTGAAAATTATGTGTGAAATTC TGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTCTTGTAAGTTAATGACCCGCGT ATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTGTTTCTGATTCCAAATTCCGT ACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGATAAAGTGTCTTGGAAGAAG TAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAGGCCTGGCTCCAGAAGTAGCAG ACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAACATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAA CAGTTATTACAGGATCCTAAACTGAGCCAAAATAAACAAGCACTTGAAG GACTGGGAGATCTGAAATTACTCTTTGAATATCTGACCTTATTTGGGATT GATGATAAAATTAGCTTTGATCTGAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTA TACCGGCGTGATTTACGAAGCTGTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGGCGG GCGAAGAGCCTTTGGGAGTCGGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGA TGGTTTGGTAGGAATGTTTGACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTG GGGCTTTCTATCGGTGTGCAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTT GAAGCTTTGGAGGAAAAGATCCGTACCACGGAaCCCAAGTCTTAGTTGC aAGTGCCCCAAAAAACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAA CTTTGGGACGCCGGCATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAGAACCCGA AATTGTTAAACCAACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGT AGCTATTATTGGTGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAAACTGCGT TCAGTAACAAGCCGTGAAGAGGTAGATGTACGTGCGGAAGACTTAGTGG AAGAAATTAAACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	196

HRS(1-506) C224S	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGAAC GCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGAAGA AGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGATGAA AGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTGATTATA GTCCACGTCAAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTTCGACGTTATTATTCGC TGTTTTAAACGTACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGTATTTGAATT GAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAAACTGATTTAT GATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCGCTACGACTTAA CTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaACCAACATCAAAC GTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACCCTGCAATGACTCGT GGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGATATTGCCGGAAATTT CGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTGTTGAAAATTATGTGTGAAATTC TGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTAAGTTAATGACCGCCGT ATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTCCGGTGTGTTCTGATTCCAAATTCGT ACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGATAAAGTGTCTTGGGAAGAAG TAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAGGCCTGGCTCCAGAAGTAGCAG ACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAACATGGCGGTGTGTCCCTAGTCGAA CAGTTATTACAGGATCCTAAACTGAGCCAAAATAAAACAAGCACTTGAAG GACTGGGAGATCTGAAATTACTCTTTGAATATCTGACCTTATTTGGGATT GATGATAAAATTAGCTTTGATCTGAGCTTGCCCCGCGTCTTGATTATTA TACCGGCGTGATTTACGAAGCTGTTCTCTTGCAAACCCAGCCCAGGCGG GCGAAGAGCCTTTGGGAGTCGGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGA TGGTTTGGTAGGAATGTTTGACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTG GGGCTTTCTATCGGTGTCGAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTT GAAGCTTTGGAGGAAAAGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGC aAGTGCCCCAAAAAAACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAA CTTTGGGACGCCGGCATCAAGGCCGAACGTGTGTATAAAAAGAACCCGA AATTGTTAAACCAACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGT AGCTATTATTGGTGAGCAAGAATTAAGATGGCGTGATTAAACTGCGT TCAGTAACAAGCCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGG AAGAAATTAAACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	197

HRS(1-506) C235S	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGAAC GCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGAAGA AGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGATGAA AGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCCAAAGGAACCCGTGATTATA GTCCACGTCAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTTCGACGTTATTATTCGC TGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGTATTTGAATT GAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAAACTGATTTAT GATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCGCTACGACTTAA CTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaACCAACATCAAAC GTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACCCTGCAATGACTCGT GGACGTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGATATTGCCGGAATTT CGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTTTGAAAATTATGTGTGAAATTC TGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAAGTTAATGACCGCCGT ATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTGTTTCTGATTCCAAATTCCGT ACAATCTCCTCAAGCGTGGACAAAATTGGATAAAGTGTCTTGGAAGAAG TAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAGGCCTGGCTCCAGAAGTAGCAG ACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAACATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAA CAGTTATTACAGGATCCTAAACTGAGCCAAAATAACAAGCACTTGAAG GACTGGGAGATCTGAAATTACTCTTTGAATATCTGACCTTATTTGGGATT GATGATAAAAATTAGCTTTGATCTGAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTA TACCGGCGTGATTTACGAAGCTGTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGGCGG GCGAAGAGCCTTTGGGAGTCGGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGA TGGTTTGGTAGGAATGTTTGACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTG GGGCTTTCTATCGGTGTGCAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTT GAAGCTTTGGAGGAAAAGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGC aAGTGCCCAAAAAAACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAA CTTTGGGACGCCGGCATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAGAACCCGA AATTGTTAAACCAACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGT AGCTATTATTGGTGAGCAAGAATTA AAAAGATGGCGTGATTAAACTGCGT TCAGTAACAAGCCGTGAAGAGGTAGATGTACGTGCGCAAGACTTAGTGG AAGAAATTAACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	198

En algunas realizaciones de la presente descripción, dichos mutantes sustituidos con cisteína se modifican para diseñar, insertar o introducir de otro modo un nuevo residuo de cisteína expuesta en la superficie en una posición expuesta en la superficie definida, donde el residuo introducido no interfiere sustancialmente en la actividad no canónica del polipéptido de HRS. Los ejemplos específicos incluyen, por ejemplo, la inserción (o reinserción) de residuos de cisteína adicionales en el extremo N o C de cualquiera de los polipéptidos de HRS con cisteína reducida descritos anteriormente. En algunas realizaciones de la presente descripción, la inserción de dichas cisteínas expuestas en la superficie N o C-terminales implica la reinserción del último 1, los últimos 2 o los últimos 3 aminoácidos C-terminales naturales de la HRS humana de longitud completa a una variante de cisteína reducida de un polipéptido de HRS, por ejemplo, la reinserción total o parcial de la secuencia CIC (Cys Ile Cys). Los ejemplos de mutantes reducidos de cisteína incluyen, por ejemplo, cualquier combinación de mutaciones (o la eliminación de) en los residuos Cys174, Cys191, Cys224 y Cys235, y o la eliminación o sustitución de Cys507 y Cys509 (basándose en la numeración de HRS humana de longitud completa (SEQ ID NO:1) en cualquiera de los polipéptidos de HRS de las SEQ ID NO:1-106, 170-181 o 185-191 o las **tablas D1, D3-D6 o D8**.

Para algunos tipos de conjugación o unión específicas de sitio a moléculas heterólogas tales como las regiones Fc o PEG u otras moléculas heterólogas, los polipéptidos de HRS pueden tener una o más sustituciones de glutamina, donde uno o más residuos de origen natural (no glutamina) están sustituidos con glutamina, por ejemplo, para facilitar la unión catalizada por transglutaminasa de la o las moléculas al grupo amida de la glutamina. En algunas realizaciones de la presente descripción, las sustituciones de glutamina se introducen cerca del extremo N y/o el extremo C del polipéptido de HRS (por ejemplo, SEQ ID NO:1-106, 170-181 o 185-191 o los polipéptidos de HRS de las **tablas D1, D3-D6 o D8**). Las realizaciones particulares de la presente descripción incluyen cuando uno o más residuos dentro de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25

aminoácidos en relación con el extremo N y/o el extremo C de cualquiera de las SEQ ID NO:1-106, 170-181 o 185-191 están sustituidos con un residuo de glutamina. Estos y los polipéptidos de HRS relacionados también pueden incluir sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas) para eliminar cualquier residuo de glutamina natural, si se desea, y regular de este modo el grado de conjugación o unión específica del sitio.

5

Para ciertos tipos de conjugación o unión específica de sitio a moléculas heterólogas tales como regiones Fc o PEG u otras moléculas heterólogas, los polipéptidos de HRS pueden tener una o más sustituciones de lisina, donde uno o más residuos de origen natural (no lisina) están sustituidos con lisina, por ejemplo, para facilitar la acilación o la unión basada en la alquilación de la o las moléculas al grupo amino de la lisina. Estos procedimientos también

10 suelen dar como resultado la unión de una o más moléculas al residuo N-terminal. En algunas realizaciones de la presente descripción, las sustituciones de lisina están cerca del extremo N y/o del extremo C del polipéptido de HRS (por ejemplo, SEQ ID NO:1-106, 170-181 o 185-191 o los polipéptidos de HRS de las **tablas D1, D3-D6 o D8**). Las realizaciones particulares de la presente descripción incluyen cuando uno o más residuos dentro de 0, 1, 2, 3, 4, 5,

15 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos hasta el extremo N y/o el extremo C de cualquiera de las SEQ ID NO:1-106, 170-181 o 185-191 (o los polipéptidos de HRS de las **tablas D1, D3-D6 o D8**) están sustituidos con un residuo de lisina. Estos y los polipéptidos de HRS relacionados también pueden incluir sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas) para eliminar cualquier residuo de lisina de origen natural, si se desea, y regular de este modo el grado de conjugación o unión específica de sitio.

- 20 La conjugación específica de sitio a polipéptidos de HRS también se puede realizar sustituyendo uno o más aminoácidos superficiales accesibles al disolvente de un polipéptido de HRS. Por ejemplo, los aminoácidos accesibles al disolvente adecuados pueden determinarse en función de la accesibilidad al disolvente predicha usando el servidor SPIDDER (<http://spider.cchmc.org/>) usando la estructura cristalina publicada de un polipéptido de HRS ejemplar (véase Xu y col. Structure, 20: 1470-7, 2012 y solicitud de Estados Unidos N.º 61/674.639).
- 25 Basándose en este análisis, varios aminoácidos en la superficie se pueden usar potencialmente como sitios de mutación para introducir grupos funcionales adecuados para la conjugación o unión. La puntuación de accesibilidad superficial de los aminoácidos basada en la estructura cristalina se puede calcular, donde las puntuaciones más altas representan una mejor accesibilidad. En realizaciones particulares de la presente descripción, se prefieren puntuaciones más altas (por ejemplo, >40). Por consiguiente, en algunas realizaciones de la presente descripción,
- 30 una posición de aminoácido que tiene una puntuación de accesibilidad en la superficie mayor que 40 puede usarse para introducir una cisteína, lisina, glutamina u otro aminoácido no natural.

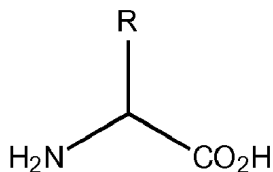
En realizaciones particulares de la presente descripción, un aminoácido de superficie accesible al disolvente se selecciona del grupo que consiste en: alanina, glicina y serina, y se puede sustituir con aminoácidos de origen

35 natural que incluyen, aunque sin limitarse a, cisteína, glutamina o lisina, o un aminoácido de origen no natural que está optimizado para la conjugación o unión específica de sitio.

- En diversas realizaciones, la presente descripción contempla la conjugación o unión específica de sitio en cualquier posición de aminoácido en un polipéptido de HRS en virtud de la sustitución de un aminoácido de origen no natural
- 40 que comprende un grupo funcional que formará un enlace covalente con el grupo funcional unido a moléculas heterólogas tales como una región Fc o PEG u otra molécula heteróloga. Los aminoácidos de origen no natural se pueden insertar o sustituir en, por ejemplo, uno o más de los residuos dentro de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos en relación con el extremo N y/o el extremo C de cualquiera de las SEQ ID NO:1-106, 170- 181, o 185-191 (o los polipéptidos de HRS de las **tablas D1, D3-D6 o D8**);
- 45 en el extremo N y/o en el extremo C de cualquiera de las SEQ ID NO:1-106, 170-181 o 185-191 (o los polipéptidos de HRS de las **tablas D1, D3-D6 o D8**); o un residuo de aminoácido superficial accesible al disolvente como se describe en el presente documento.

- En realizaciones particulares de la presente descripción, los aminoácidos de origen no natural incluyen, sin
- 50 limitación, cualquier aminoácido, aminoácido modificado o análogo de aminoácido distinto de la selenocisteína y los siguientes veinte alfa-aminoácidos codificados genéticamente: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina. La estructura genérica de un alfa-aminoácido se ilustra mediante la siguiente fórmula:

55



Un aminoácido no natural es típicamente cualquier estructura que tenga la fórmula anterior donde el grupo R es cualquier sustituyente distinto de uno usado en los veinte aminoácidos naturales. Véase, por ejemplo, textos de bioquímica tales como Biochemistry de L. Stryer, 3ª ed. 1988, Freeman and Company, Nueva York, para las estructuras de los veinte aminoácidos naturales. Téngase en cuenta que los aminoácidos no naturales divulgados en el presente documento pueden ser compuestos de origen natural distintos de los veinte alfa-aminoácidos anteriores. Debido a que los aminoácidos no naturales divulgados en el presente documento difieren típicamente de los aminoácidos naturales en la cadena lateral solamente, los aminoácidos no naturales forman enlaces amida con otros aminoácidos, por ejemplo, naturales o no naturales, de la misma manera en que se forman en proteínas de origen natural. Sin embargo, los aminoácidos no naturales tienen grupos de cadena lateral que los distinguen de los aminoácidos naturales. Por ejemplo, R en la fórmula anterior comprende opcionalmente un haluro de alquilo, arilo, arilo, haluro de vinilo, haluro de alquilo, acetilo, cetona, aziridina, nitrilo, nitro, haluro, acil-, ceto-, azido-, hidroxil-, hidracina-, ciano-, halo-, hidrazida, alquenilo, alquinilo, éter, tio éter, epóxido, sulfona, ácido borónico, éster de boronato, borano, ácido fenilborónico, tiol, seleno-, sulfonil-, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico-, piridilo, naftilo, benzofenona, un anillo restringido tal como un grupo ciclooctilo, tio éster, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina, amino, ácido carboxílico, ácido alfa-ceto carboxílico, ácidos alfa o beta-insaturados y amidas, glioxil amida, u organosilano, o similares, o cualquier combinación de los mismos.

Los ejemplos específicos de aminoácidos no naturales incluyen, aunque sin limitarse a, p-acetil-L-fenilalanina, O-metil-L-tirosina, una L-3-(2-naftil)alanina, una 3-metil-fenilalanina, y O-4-alil-L-tirosina, una 4-propil-L-tirosina, una tri-O-acetil-GlcNAc-β-serina, β-O-GlcNAc-L-serina, una tri-O-acetil-GalNAc-α-treonina, una α-GalNAc-L-treonina, una L-Dopa, una fenilalanina fluorada, una isopropil-L-fenilalanina, una p-azido-L-fenilalanina, una p-acil-L-fenilalanina, una p-benzoil-L-fenilalanina, una L-fosfoserina, una fosfonoserina, una fosfotirosina, una p-yodo-fenilalanina, una p-bromofenilalanina, una p-amino-L-fenilalanina, una isopropil-L-fenilalanina, las enumeradas a continuación, o en otra parte en el presente documento, y similares.

Por consiguiente, se puede seleccionar un aminoácido de origen no natural que comprende un grupo funcional que forma un enlace covalente con cualquier grupo funcional preferido de una molécula deseada (por ejemplo, región Fc, PEG). Los aminoácidos no naturales, una vez seleccionados, pueden adquirirse de proveedores o sintetizarse químicamente. Se puede incorporar cualquier número de aminoácidos no naturales en la molécula diana y puede variar de acuerdo con el número de moléculas deseadas a unir. Las moléculas pueden estar unidas a todos o solo a algunos de los aminoácidos no naturales. Además, se pueden incorporar los mismos o diferentes aminoácidos no naturales en un polipéptido de HRS, dependiendo del resultado deseado. En ciertas realizaciones de la presente descripción, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos no naturales se incorporan a un polipéptido de HRS, cualquiera o todos los cuales pueden estar conjugados a una molécula que comprende un grupo funcional deseado.

En ciertos aspectos de la presente descripción, el uso de aminoácidos no naturales puede utilizarse para modificar (por ejemplo, aumentar) una actividad no canónica seleccionada de un polipéptido de HRS, o para alterar la semivida *in vivo* o *in vitro* de la proteína. Los aminoácidos no naturales también se pueden usar para facilitar modificaciones químicas (selectivas) (por ejemplo, pegilación) de una proteína de HRS, como se describe en otra parte en el presente documento. Por ejemplo, ciertos aminoácidos no naturales permiten la unión selectiva de polímeros tales como una región Fc o PEG a una proteína dada, y, por lo tanto, mejoran sus propiedades farmacocinéticas.

Los ejemplos específicos de análogos y miméticos de aminoácidos se pueden encontrar descritos, por ejemplo, en Roberts y Vellaccio, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Eds. Gross y Meinhofer, vol. 5, p. 341, Academic Press, Inc., Nueva York, N.Y. (1983). Otros ejemplos incluyen aminoácidos peralquilados, particularmente aminoácidos permetilados. Véase, por ejemplo, Combinatorial Chemistry, Eds. Wilson y Zarnik, cap. 11, p. 235, John Wiley & Sons Inc., Nueva York, N.Y. (1997). Otros ejemplos más incluyen aminoácidos cuya parte (y, por lo tanto, el esqueleto de amida del péptido resultante) se ha reemplazado, por ejemplo, por un anillo de azúcar, esteroide, benzodiazepina o ciclo carbo. Véase, por ejemplo, Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Ed. Manfred E. Wolff, cap. 15, págs. 619-620, John Wiley & Sons Inc., Nueva York, N.Y. (1995). Los procedimientos para sintetizar péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos y proteínas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente

de Estados Unidos N.º 5.420.109; M. Bodanzsky, *Principles of Peptide Synthesis* (1ª ed. Y 2ª ed. rev.), Springer-Verlag, Nueva York, NY (1984 y 1993), véase el capítulo 7; Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, (2ª ed.), Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois (1984)). Por consiguiente, los polipéptidos de HRS de la presente descripción pueden estar compuestos por aminoácidos de origen natural y de origen no natural, así como por

5 análogos y miméticos de aminoácidos.

Polinucleótidos

Ciertas realizaciones de la presente descripción se refieren a polinucleótidos que codifican un polipéptido de HRS o

10 una proteína de fusión HRS-Fc. También se incluyen los polinucleótidos que codifican una o más de las regiones Fc descritas en el presente documento, solas o en combinación con una secuencia codificante de HRS. Entre otros usos, estas realizaciones de la presente descripción pueden utilizarse para producir de forma recombinante una HRS, región Fc, o polipéptido HRS-Fc o variante del mismo deseado, o para expresar el polipéptido de HRS, la región Fc o HRS-Fc en una célula o sujeto seleccionados. Los expertos en la materia apreciarán que, como

15 resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de fusión HRS-Fc del polipéptido de HRS como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos pueden tener una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente en la presente descripción, por ejemplo, polinucleótidos que están optimizados para la selección de

20 codones humanos, de levadura o bacterianos.

Como reconocerá el experto en la materia, los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Secuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden, pero no es necesario, estar presentes dentro de un polinucleótido

25 de la presente descripción, y un polinucleótido puede, pero es necesario, estar unido a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un polipéptido de fusión HRS-Fc o una parte del mismo) o pueden comprender una variante, o un equivalente funcional

30 biológico de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótidos pueden contener una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones y/o inserciones, como se describe adicionalmente a continuación, preferentemente de modo que la actividad del polipéptido codificado no disminuya sustancialmente con respecto al polipéptido no modificado.

En realizaciones adicionales, la presente descripción proporciona polinucleótidos aislados que comprenden diversas

35 longitudes de tramos contiguos de secuencia idénticos o complementarios a un polipéptido de HRS o proteína de fusión HRS-Fc, donde los polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de HRS truncado como se describe en el presente documento.

Por lo tanto, múltiples polinucleótidos pueden codificar los polipéptidos de HRS, las regiones Fc y las proteínas de fusión de la presente descripción. Además, la secuencia de polinucleótidos se puede manipular por diversas

40 razones. Los ejemplos incluyen, aunque no se limitan a, la incorporación de codones preferidos para mejorar la expresión del polinucleótido en diversos organismos (véase en general Nakamura y col., *Nuc. Acid. Res.* 28: 292, 2000). Además, se pueden incorporar mutaciones silenciosas para introducir, o eliminar sitios de restricción, disminuir la densidad de los motivos de dinucleótidos CpG (véase, por ejemplo, Kameda y col., *Biochys. Biophys.*

45 *Res. Commun.* 349: 1269-1277, 2006) o reducir la capacidad de las secuencias monocatenarias para formar estructuras de tallo-bucle: (véase, por ejemplo, Zuker M., *Nucl. Acid Res.* 31: 3406-3415, 2003). Además, la expresión en mamíferos puede optimizarse aún más al incluir una secuencia de consenso de Kozak (es decir, (a/g)cc(a/g)ccATGg) (SEQ ID NO:199) en el codón de inicio. Las secuencias de consenso de Kozak útiles para este fin son conocidas en la técnica (Mantyh y col., *PNAS* 92: 2662-2666, 1995; Mantyh y col., *Prot. Exp. & Purif.* 6: 124,

50 1995). Las versiones ejemplares de tipo silvestre y con optimización de codones de diversos polipéptidos de HRS se proporcionan en la **tabla D9** a continuación.

Tabla D9 Secuencias de ADN con optimización de codones			
Nombre	Intervalo de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1	Secuencia de ácido nucleico	SEQ ID NO
Tipo silvestre (HisRS de longitud completa)	1-509	ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAACTTCA GGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCG CCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAACTCCTGAACTG AAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTG CTAAAACCCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGGCAG ATGGCAGTTCGCGAGAAGGTGTTTGACGTAATCATCCGTTGC TTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATACACCTGTATTT GAACTAAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGGAAGACTC CAAGCTTATCTATGACCTGAAGGACCAGGGCGGGGAGCTCCT GTCCCTTCGCTATGACCTCACTGTTCTTTTGCTCGGTATTTGG CAATGAATAAACTGACCAACATTAACGCTACCACATAGCAA AGGTATATCGGCGGGATAACCCAGCCATGACCCGTGGCCGAT ACCGGGAATTCTACCAGTGTGATTTTGACATTGCTGGGAACTT TGATCCCATGATCCCTGATGCAGAGTGCCTGAAGATCATGTG CGAGATCCTGAGTTCACTTCAGATAGGCGACTTCCTGGTCAA GGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTTGCTATCTG TGGTGTTTCTGACAGCAAGTTCCTGACCATCTGCTCCTCAGTA GACAAGCTGGACAAGGTGTCTGGGAAGAGGTGAAGAATGA GATGGTGGGAGAGAAGGGCCTTGACCTGAGGTGGCTGACC GCATTGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTGGGGTATCCCTGG TGGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAAACTATCCCCAAAACAAGC AGGCCTTGAGGGCCTGGGAGACCTGAAGTTGCTCTTTGAGT ACCTGACCCTATTTGGCATTGATGACAAAATCTCCTTTGACCT GAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTACACTGGGGTGATCTA TGAGGCAGTGCTGCTACAGACCCCAGCCCAGGCAGGGGAAG AGCCCCTGGGTGTGGGCAGTGTGGCTGCTGGAGGACGCTATG ATGGGCTAGTGGGCATGTTCGACCCCAAAGGGCGCAAGGTGC CATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGTGGAGCGGATTTTCTCCA TCGTGGAACAGAGACTAGAGGCTTTGGAGGAGAAGATACGG ACCACGGAGACACAGGTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAA GCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTTGTCTCAGAACTGTGGGA TGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCCAAA GCTACTGAACCAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCC ACTGGTGGCTATCATCGGCGAGCAGGAACTCAAGGATGGGGT CATCAAGCTCCGTTTCAGTGACGAGCAGGGAAGAGGTGGATGT CCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAGGAGAACAG GCCAGCCCCTCTGCATCTGC	111

HisRS1 N1	1-141	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACCTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGTC CTGAAAACCTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCAA ATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTCGCTGC TTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTTT GAGCTGAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACAG CAAACCTGATTTATGACCTGAAAGATCAGGGTGGTGAACCTGCT GAGTCTGCGCTATGATCTGACAGTTCCGTTTGCCCGTTATCTG GCAATG	112
HisRS 1N2	1-408	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACCTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGTC CTGAAAACCTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCAA ATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTCGCTGC TTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTTT GAGCTGAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACAG CAAACCTGATTTATGACCTGAAAGATCAGGGTGGTGAACCTGCT GAGTCTGCGCTATGATCTGACAGTTCCGTTTGCCCGTTATCTG GCAATGAATAAACTGACCAACATTAACGCTATCACATTGCT AAAGTCTATCGCCGTGACAATCCTGCTATGACCCGTGGTCGTT ATCGTGAGTTCTATCAGTGTGACTTCGATATTGCCGGCAACTT TGATCCGATGATCCCGGATGCTGAATGCCTGAAAATCATGTG TGAGATCCTGAGCAGTCTGCAGATTGGCGATTTCCTGGTGAA AGTCAACGATCGCCGTATTCTGGATGGCATGTTCCGCATCTGT GGTGTTAGCGACTCCAAATTCCGTACCATCTGTAGTAGTGTG GACAACTGGATAAAGTGAGCTGGGAGGAGGTGAAAAACGA AATGGTGGGCGAGAAAGGTCTGGCTCCTGAAGTGGCTGACCG TATTGGTGATTATGTCCAGCAGCACGGTGGAGTATCACTGGT TGAGCAACTGCTGCAAGACCCTAAACTGAGTCAGAATAAACA GGCCCTGGAGGGACTGGGAGATCTGAAACTGCTGTTCGAGTA TCTGACCCTGTTCGGTATCGATGACAAAATCTCCTTTGACCTG TCACTGGCTCGTGGACTGGACTATTATACCGGCGTGATCTATG AAGCTGTACTGCTGCAAACTCCAGCACAAAGCAGGTGAAGAGC CTCTGGGTGTGGGTAGTGTAGCCGCTGGGGGACGTTATGATG GACTGGTGGGGATGTTTCGACCCTAAAGGCCGTAAAGTTCCGT GTGTGGGTCTGAGTATCGGTGTTGAGCGTATCTTTTCCATCGT CGAGCAACGTCTGGAAGCACTGGAGGAAAAAATCCGTACGA CCGAA	113
HisRS1 N3	1-113	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACCTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGTC CTGAAAACCTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCAA ATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTCGCTGC TTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTTT GAGCTGAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACAG CAAACCTG	114

HisRS 1 ^{N4}	1-60	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAAGCTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGTC CTGAAAAGTCCGAAG	115
HisRS1 N8	1-506	ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAGTTC GGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCG CCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTG AAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTG CTCAAAACCCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGGCAG ATGGCAGTTCGCGAGAAGGTGTTTGACGTAATCATCCGTTGC TTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATACACCTGTATTT GAACTAAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGGAAGACTC CAAGCTTATCTATGACCTGAAGGACCAGGGCGGGGAGCTCCT GTCCCTTCGCTATGACCTCACTGTTCTTTTGCTCGGTATTTGG CAATGAATAAACTGACCAACATTAACGCTACCACATAGCAA AGGTATATCGGCGGGGATAACCCAGCCATGACCCGTGGCCGAT ACCGGGAATTCTACCAGTGTGATTTTGACATTGCTGGGAAGT TGATCCCATGATCCCTGATGCAGAGTGCCTGAAGATCATGTG CGAGATCCTGAGTTCACCTCAGATAGGCGACTTCCTGGTCAA GGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGTTTGCTATCTG TGGTGTCTTGACAGCAAGTTCCTGACCATCTGCTCCTCAGTA GACAAGCTGGACAAGGTGTCCTGGGAAGAGGTGAAGAATGA GATGGTGGGAGAGAAGGGCCTTGACCTGAGGTGGCTGACC GCATTGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTGGGGTATCCCTGG TGGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAAACTATCCCCAAAACAAGC AGGCCTTGAGGGGCCTGGGAGACCTGAAGTTGCTCTTTGAGT ACCTGACCCTATTTGGCATTGATGACAAAATCTCCTTTGACCT GAGCCTTGCTCGAGGGGCTGGATTACTACACTGGGGTGATCTA TGAGGCAGTGCTGCTACAGACCCAGCCAGGCAGGGGAAG AGCCCCGTTGGTGTGGGCAGTGTGGCTGCTGGAGGACGCTATG ATGGGCTAGTGGGCATGTTTCGACCCCAAAGGGCGCAAGGTGC CATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGTGGAGCGGATTTTCTCCA TCGTGGAACAGAGACTAGAGGCTTTGGAGGAGAAGATACGG ACCACGGAGACACAGGTGCTTGTGGCATCTGCACAGAAGAA GCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCTTGTCTCAGAACTGTGGGA TGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGCTGTACAAGAAGAACCCAAA GCTACTGAACCAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCC ACTGGTGGCTATCATCGGCGAGCAGGAAGTCAAGGATGGGGT CATCAAGCTCCGTTCAAGTACGAGCAGGGAAGAGGTGGATGT CCGAAGAGAAGACCTTGTGGAGGAAATCAAAAGGAGAACAG GCCAGCCCCCTC	116
HisRS1 N6	1-48	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAAGCTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGAT	117

HisRS 1 ¹¹	191-333	TGCCTGAAAATCATGTGTGAGATCCTGAGTAGTCTGCAAATT GGCGACTTTCTGGTCAAAGTGAACGATCGCCGTATTCTGGAT GGCATGTTTCGCCATCTGTGGTGTAGCGACTCCAAATTCCGTA CAATCTGTAGCAGCGTGGACAAACTGGATAAAGTGTCTGGG AAGAGGTGAAAAACGAAATGGTGGGTGAAAAAGGTCTGGCT CCGGAGGTTGCTGACCGTATCGGTGATTATGTTTCAGCAGCAC GGCGGTGTTAGTCTGGTTGAACAACTGCTGCAAGACCCGAAA CTGTCTCAGAACAAACAGGCCCTGGAAGGACTGGGAGATCTG AAACTGCTGTTTCGAGTATCTGACGCTGTTTCGGCATTGATGAC AAAATTTCTTTCGACCTGTCACTGGCACGTGGACTGGACTATT ATACCGGT	118
HisRS1 C1	405-509	CGTACCACCGAAACCCAAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAAA AAACTGCTGGAAGAACGCCTGAAACTGGTTAGCGAACTGTGG GATGCTGGCATTAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAACCCG AAACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGGTATT CCTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAGACGGC GTTATTAACTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAAGTTGAC GTTCCCGTGAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACGTCGTACC GGTCAACCTCTGTGTATTTGC	119
HisRS1 N5	1-243 27aa +	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACCTGCA AGGCGAGCGTGTTCTGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGTC CTGAAAACCTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCAA ATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTGCTGC TTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTTT GAGCTGAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACAG CAAACCTGATCTATGACCTGAAAGACCAAGGCGGTGAACTGCT GTCCCTGCGTTATGATCTGACTGTGCCGTTTGCCCGTTATCTG GCCATGAATAAACTGACGAACATTAAACGCTATCACATTGCC AAAGTGTATCGCCGTGACAATCCTGCTATGACTCGTGGACGT TATCGTGAATTCTATCAGTGTGACTTCGATATTGCCGGCAACT TCGACCCTATGATTCCGGATGCTGAATGCCTGAAAATCATGT GTGAGATCCTGAGCAGCCTGCAAATTGGTGACTTCCTGGTGA AAGTGAATGACCGTCGTATCCTGGATGGCATGTTTGCCATTTG TGGTGTGAGCGATTCCAAATTCCGTACCATCTGTAGTAGTGTG GACAAACTGGATAAAGTGGGCTATCCGTGGTGGAACTCTTGT AGCCGTATTCTGAACTATCCTAAAACCAGCCGCCCGTGGCGT GCTTGGGAAACT	120

HisRS1 C2	1-60+175- 509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACCTGCA AGGCGAGCGTGTTCTGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGTC CTGAAAACCTCCGAAAGACTTCGATATTGCCGGGAATTTTGAC CCTATGATCCCTGATGCCGAATGTCTGAAAATCATGTGTGAG ATCCTGAGCAGTCTGCAGATTGGTGACTTCCTGGTGAAAGTG AACGATCGCCGTATTCTGGATGGAATGTTTGCCATTTGTGGCG TGTCTGACAGCAAATTTCTACGATCTGTAGCAGCGTGGATA AACTGGATAAAGTGAGCTGGGAGGAGGTGAAAAATGAGATG GTGGGCGAAAAAGGTCTGGCACCTGAAGTGGCTGACCGTATC GGTGATTATGTTTCAGCAACATGGCGGTGTTTCTCTGGTCAAC AGCTGCTGCAAGACCCAAAACCTGAGCCAGAACAAACAGGCA CTGGAAGGACTGGGTGATCTGAAACTGCTGTTTGAGTATCTG ACGCTGTTTGGCATCGATGACAAAATCTCGTTTGACCTGAGC CTGGCACGTGGTCTGGATTATTATACCGGCGTGATCTATGAA GCCGTCCTGCTGCAAACCTCCAGCACAAAGCAGGTGAAGAACCT CTGGGTGTTGGTAGTGTAGCGGCAGGCGGACGTTATGATGGA CTGGTGGGGATGTTTGATCCGAAAGGCCGTAAAGTTCCGTGT GTCGGTCTGAGTATCGGGGTTGAGCGTATCTTTAGCATTGTGG AGCAACGTCTGGAAGCTCTGGAGGAAAAAATCCGTACCACCG AAACCCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGG AAGAACGCCTGAAACTGGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCA TTAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGA ATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGGTATTCCTCTGGTGG CCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAGACGGCGTTATTAAAC TGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCCCGTG AAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACCTC TGTGTATTTGC	121

HisRS1 C3	1-60+211- 509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACCTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGTC CTGAAAACCTCCGAAAGTGAATGATCGCCGTATCCTGGATGGC ATGTTTGCCATTTGTGGTGTGAGCGACTCGAAATTCCGTACGA TTTGCTCTAGCGTCGATAAACTGGACAAAGTGTCTTGGAAG AGGTGAAAAACGAGATGGTGGGTGAGAAAGGTCTGGCTCCT GAAGTTGCCGACCGTATTGGTGATTATGTTTCAGCAGCATGGC GGTGTTCCTGTTGAACAACCTGCTGCAAGACCCGAAACTG TCTCAGAATAAACAGGCGCTGGAAGGACTGGGAGATCTGAA ACTGCTGTTTGAGTATCTGACCCTGTTTCGGCATTGATGACAAA ATCAGCTTCGACCTGAGCCTGGCACGTGGTCTGGATTATTATA CCGGCGTGATCTATGAAGCCGTTCTGCTGCAGACACCAGCAC AAGCAGGCGAAGAACCCTCTGGGTGTTGGTTCTGTGCGAGCCG GTGGTCGTTATGATGGACTGGTAGGCATGTTTCGATCCGAAAG GCCGTAAAGTTCCGTGTGTGGGACTGAGTATCGGTGTTGAGC GTATCTTTAGCATCGTGGAACAACGTCTGGAAGCGCTGGAGG AGAAAATTCGTACCACCGAAACCCAAGTTCTGGTTGCCTCAG CTCAGAAAAAACTGCTGGAAGAACGCCTGAACTGGTTAGCG AACTGTGGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACCTGCTGTATAAAA AAAACCCGAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAG CGGGTATTCTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAAGTGA AAGACGGCGTTATTAAACTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAG AAGTTGACGTTCCCGTGAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAAC GTCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTGTC	122

HisRS1 C4	1-100 + 211-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGTC CTGAAAACTCCGAAAGGAACCTCGTGATTATAGCCCTCGCCAG ATGGCTGTCCGTGAAAAAGTGTTCGATGTGATCATTTCGCTGCT TCAAACGTCATGGTGCCGAAGTCATTGATACCCCGGTGTTTCG AGCTGAAAGTGAACGATCGCCGTATTCTGGATGGCATGTTTCG CCATTTGTGGTGTTAGCGATAGCAAATTCCGTACAATCTGCTC TAGCGTGGACAAACTGGACAAAGTGAGCTGGGAAGAGGTGA AAAACGAGATGGTGGGTGAGAAAGGCCTGGCTCCTGAAGTT GCCGACCGTATCGGAGATTATGTTTCAGCAGCATGGCGGAGTT TCACTGGTTGAACAACTGCTGCAAGACCCGAAACTGTCTCAG AACAAACAGGCACTGGAAGGTCTGGGAGATCTGAAACTGCT GTTTCGAGTATCTGACGCTGTTTCGGTATTGACGACAAAATTTCC TTCGACCTGTCGCTGGCACGTGGTCTGGATTATTATACAGGCG TGATCTATGAGGCTGTACTGCTGCAGACACCAGCACAAAGCAG GTGAAGAGCCTCTGGGTGTTGGTTCAGTTGCTGCCGGTGGAC GTTATGACGGACTGGTAGGGATGTTTGACCCAAAAGGCCGTA AAGTCCCGTGTGTAGGACTGTCTATTGGCGTTGAGCGTATCTT TAGCATCGTGGAGCAACGTCTGGAAGCTCTGGAGGAGAAAAT CCGTACCACCGAAACCCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAA AAAACTGCTGGAAGAACGCCTGAAACTGGTTAGCGAACTGTG GGATGCTGGCATTAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAACCC GAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGGTAT TCCTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAGACGG CGTTATTAACCTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAAGTTGA CGTTCGCCGTGAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACGTCGTAC CGGTCAACCTCTGTGTATTTGC	123

HisRS1 C5	1-174 + 211-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACCTGCA AGGCGAGCGTGTTCTGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGTC CTGAAAACCTCCGAAAGGAACTCGTGATTATAGCCCTCGCCAG ATGGCTGTCCGTGAAAAAGTGTTGATGTGATCATTTCGCTGCT TCAAACGTCATGGTGCCGAAGTCATTGATACCCCGGTGTTTCG AGCTGAAAGAAACCCTGATGGGCAAATATGGGGAAGATTCC AAACTGATCTATGACCTGAAAGACCAGGGAGGTGAACTGCTG TCTCTGCGCTATGACCTGACTGTTCTTTTGCTCGCTATCTGG CCATGAATAAACTGACCAACATCAAACGCTATCATATCGCCA AAGTGTATCGCCGTGACAATCCAGCAATGACCCGTGGTTCGT ATCGTGAATTTTATCAGTGTGTGAACGATCGCCGTATTCTGGA CGGCATGTTTCGCCATTTGTGGTGTGTCTGACTCCAAATTTCTG ACGATCTGCTCAAGCGTGGACAAACTGGACAAAGTGAGCTGG GAAGAGGTGAAAAACGAGATGGTGGGTGAGAAAGGCCTGGC TCCTGAAGTTGCCGACCGTATCGGAGATTATGTTTCAGCAGCA TGGCGGAGTTTCACTGGTTGAACAACTGCTGCAAGACCCGAA ACTGTACAGAACAAACAGGCACTGGAAGGTCTGGGGGATCT GAAACTGCTGTTTCGAGTATCTGACGCTGTTTCGGTATTGACGA CAAAATCAGCTTCGATCTGAGCCTGGCACGTGGTCTGGACTA TTATACCGGCGTGATTTATGAAGCCGTTCTGCTGCAGACTCCA GCACAAGCAGGTGAAGAGCCTCTGGGTGTTGGAAGTGTGGCA GCCGGTGGCCGTTATGATGGTCTGGTTGGCATGTTTGACCCG AAAGGCCGTAAAGTCCCGTGTGTAGGACTGTCTATCGGCGTG GAGCGTATTTTATGATCGTGGAACAACGCCTGGAAGCTCTG GAAGAGAAAATCCGTACCACCGAAACCCAAGTTCTGGTTGCC TCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAAGAACGCCTGAAACTGGTT AGCGAACTGTGGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACTGCTGTAT AAAAAAAACCCGAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAG GAAGCGGGTATTCCTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAA CTGAAAGACGGCGTTATTAAACTGCGTAGCGTGACCTCTCGT GAAGAAGTTGACGTTCCCGTGAAGATCTGGTCGAGGAAATC AAACGTCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTTGC	124

HisRS1 C6	1-60 + 101-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGTC CTGAAAACTCCGAAAGAAACCCTGATGGGCAAATATGGCGA AGATTCCAAACTGATCTATGACCTGAAAGACCAAGGCGGTGA ACTGCTGTCCCTGCGTTATGACCTGACTGTTCCGTTTGCTCGT TATCTGGCCATGAATAAACTGACCAACATTAAACGCTATCAC ATTGCCAAAGTGTATCGCCGTGACAATCCTGCTATGACTCGT GGACGTTATCGTGAATTCTATCAGTGTGACTTCGATATTGCCG GCAACTTCGACCCTATGATTCCGGATGCTGAATGCCTGAAAA TCATGTGTGAGATCCTGAGCAGCCTGCAAATTGGTGACTTCCT GGTGAAAGTGAATGACCGTCGTATCCTGGATGGCATGTTCCG CATTTGTGGTGTAGCGATTCCAAATTCCGTACCATCTGTAGT AGTGTGGACAAACTGGATAAAGTGAGCTGGGAAGAGGTGAA AAACGAAATGGTGGGCGAAAAAGGTCTGGCACCTGAGGTTG CTGATCGTATCGGTGACTATGTCCAGCAGCATGGAGGTGTTT CACTGGTTGAGCAACTGCTGCAAGATCCGAAACTGTCTCAGA ACAAACAGGCCCTGGAAGGACTGGGTGATCTGAAACTGCTGT TCGAGTATCTGACGCTGTTTCGGTATTGATGACAAAATCTCGTT CGACCTGTCTCTGGCTCGTGGACTGGATTATTATACGGGCGTA ATCTATGAAGCTGTCCTGCTGCAGACACCAGCACAAAGCAGGT GAAGAGCCTCTGGGTGTTGGAAGTGTTGCTGCCGGTGGTCCG TATGACGGACTGGTTGGCATGTTTCGATCCGAAAGGCCGTAAA GTTCCGTGTGTAGGACTGAGCATTGGCGTTGAGCGTATCTTTT CCATCGTTGAGCAACGTCTGGAAGCACTGGAAGAGAAAAATCC GTACCACCGAAACCCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAAAA AACTGCTGGAAGAACGCCTGAAACTGGTTAGCGAACTGTGGG ATGCTGGCATTAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGA AACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGGTATTC CTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAGACGGCG TTATTAACTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAAGTTGACG TTCGCCGTGAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACGTCGTACCG GTCAACCTCTGTGTATTTC	125

HisRS1 C7	1-100 + 175-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACCTGCA AGGCGAGCGTGTTCTGTTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAAACAAAAATTCGTC CTGAAAACCTCCGAAAGGAACCTCGTGATTATAGCCCTCGCCAG ATGGCTGTCCGTGAAAAAGTGTTTCGATGTGATCATTTCGCTGCT TCAAACGTCATGGTGCCGAAGTCATTGATACCCCGGTGTTTCG AGCTGAAAGATTTTCGATATTGCCGGCAACTTTGATCCGATGA TTCCGGATGCTGAGTGTCTGAAAATCATGTGTGAGATCCTGA GTAGTCTGCAGATTGGGGATTTCTTGGTGAAAGTGAACGATC GCCGTATTCTGGACGGCATGTTTGCCATTTGTGGCGTTAGCGA TAGCAAATTCCGTACGATCTGTAGCAGTGTGGACAAACTGGA TAAAGTCTCTTGGGAAGAGGTCAAAAACGAGATGGTTGGTGA GAAAGGCCTGGCTCCTGAAGTGGCTGACCGTATTGGTGATTA TGTCAGCAGCATGGTGGTGTTCCTGTTGAAACAACTGCT GCAAGACCCGAAACTGTCTCAGAACAACAGGCACTGGAAG GTCTGGGTGATCTGAAACTGCTGTTTCGAGTATCTGACGCTGTT CGGTATTGACGACAAAATTTCTTTCGACCTGTCACTGGCACGT GGTCTGGATTATTATACAGGCGTAATCTATGAGGCTGTACTG CTGCAAACTCCAGCACAAAGCAGGTGAAGAACCTCTGGGAGTT GGTAGTGTAGCGGCAGGGGGTCGTTATGATGGGCTGGTCGGG ATGTTTCGATCCAAAAGGCCGTAAAGTCCCGTGTGTTGGTCTG TCTATTGGCGTTGAGCGTATCTTCTCCATCGTGGAGCAACGTC TGGAAGCTCTGGAAGAAAAAATCCGTACCACCGAAACCCAA GTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAAGAACGC CTGAAACTGGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCATTAAAGCC GAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGAATCAGCTG CAGTATTGTGAGGAAGCGGGTATTCTCTGGTGGCCATTATC GGAGAACAGGAACTGAAAGACGGCGTTATTAACTGCGTAG CGTGACCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCCCGGTGAAGATCT GGTCGAGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACCTCTGTGTAT TTGC	126
HisRS1 C10	369-509	ATGTTTCGACCCAAAAGGCCGTAAAGTTCCGTGTGTAGGGCTG TCTATCGGTGTTGAGCGTATCTTCTCCATCGTTGAGCAGCGTC TGGAAGCACTGGAGGAAAAAATCCGTACGACCGAGACTCAA GTCCTGGTTGCTAGTGCCAGAAAAAACTGCTGGAAGAGCGC CTGAAACTGGTTAGTGAGCTGTGGGATGCCGGTATTAAAGCC GAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGAATCAGCTG CAGTATTGTGAAGAAGCGGGCATTCCGCTGGTAGCGATTATC GGGGAACAAGAACTGAAAGATGGCGTGATCAAACCTGCGTAG CGTTACAAGCCGTGAGGAAGTGGACGTCCGCCGTGAGGATCT GGTTGAAGAGATTAAACGCCGTACAGGTCAGCCTCTGTGTAT TTGC	127

Seuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden, pero no es necesario, estar presentes dentro de un polinucleótido de la presente descripción, y un polinucleótido puede, pero no es necesario, estar unido a otras moléculas y/o materiales de soporte. Por lo tanto, los polinucleótidos de la presente descripción, independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, pueden combinarse con otras secuencias de ADN o ARN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes y similares, de modo que su longitud total puede variar considerablemente.

Por lo tanto, se contempla que se pueda emplear un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud; con la

- longitud total preferentemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante deseado. Se incluyen polinucleótidos de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32., 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 270, 280, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2800, 2900, 3000 o más (incluyendo todos los números enteros intermedios) bases de longitud, incluyendo cualquier parte o fragmento (por ejemplo, mayor de aproximadamente 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud) de un polinucleótido de HRS de referencia (por ejemplo, número de bases X-Y, donde X es aproximadamente 1-3000 o más e Y es aproximadamente 10-3000 o más), o su complemento.
- Las realizaciones de la presente descripción también incluyen «variantes» de las secuencias de polinucleótidos de HRS de referencia. Las «variantes» de polinucleótidos pueden contener una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones y/o inserciones en relación con un polinucleótido de referencia. Generalmente, las variantes de una secuencia de polinucleótidos de HRS de referencia pueden tener al menos aproximadamente el 30 %, 40 % 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, generalmente al menos aproximadamente el 75 %, 80 %, 85 %, deseablemente aproximadamente del 90 % al 95 % o más, y más adecuadamente aproximadamente el 98 % o más de identidad de secuencia con esa secuencia de nucleótidos particular (tal como por ejemplo, las SEQ ID NO:111-127, 182-184, 192-198; véase también los ejemplos) de acuerdo con lo determinado por los programas de alineamiento de secuencias descritos en otra parte en el presente documento usando parámetros por defecto. En ciertas realizaciones de la presente descripción, las variantes pueden diferir de una secuencia de referencia en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100 (incluyendo todos los números enteros intermedios) o más bases. En ciertas realizaciones de la presente descripción, tal como cuando la variante de polinucleótido codifica un polipéptido de HRS que tiene una actividad no canónica, la actividad deseada del polipéptido de HRS codificado no disminuye sustancialmente con respecto al polipéptido no modificado. El efecto sobre la actividad del polipéptido codificado puede evaluarse generalmente como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones de la presente descripción, las variantes pueden alterar el estado de agregación de los polipéptidos de HRS, por ejemplo para proporcionar polipéptidos de HRS que existen en diferentes realizaciones de la presente descripción principalmente como un monómero, dímero o multímero.
- Ciertas realizaciones de la presente descripción incluyen polinucleótidos que hibridan con una secuencia de polinucleótidos de HRS de referencia (tal como por ejemplo, SEQ ID NO:111-127, 182-184, 192-198; véanse también los ejemplos) o sus complementos, bajo condiciones de rigurosidad descritas a continuación. Como se usa en el presente documento, el término «hibrida en condiciones de baja rigurosidad, rigurosidad media, alta rigurosidad o rigurosidad muy alta» describe las condiciones para la hibridación y el lavado. Se puede encontrar orientación para realizar reacciones de hibridación en Ausubel y col., (1998, citado anteriormente), Secciones 6.3.1-6.3.6. Procedimientos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia y se pueden usar cualquiera de ellos.
- Las referencias en el presente documento a condiciones de baja rigurosidad incluyen y abarcan desde al menos aproximadamente el 1 % v/v hasta al menos aproximadamente el 15 % v/v de formamida y desde al menos aproximadamente 1 M hasta al menos aproximadamente 2 M de sal para hibridación a 42 °C, y al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M de sal para lavado a 42 °C. Las condiciones de baja rigurosidad también pueden incluir albúmina de suero bovino (BSA) al 1 %, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7 % para hibridación a 65 °C y (i) 2 × SSC, SDS al 0,1 %; o (ii) BSA al 0,5 %, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM (pH 7,2), SDS al 5 % para lavado a temperatura ambiente. Una realización de la presente descripción de condiciones de baja rigurosidad incluye la hibridación en 6 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguida de dos lavados en 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % al menos a 50 °C (la temperatura de los lavados se puede aumentar a 55 °C para condiciones de baja rigurosidad).
- Las condiciones de rigurosidad media incluyen y abarcan desde al menos aproximadamente el 16 % v/v hasta al menos aproximadamente el 30 % v/v de formamida y desde al menos aproximadamente 0,5 M hasta al menos aproximadamente 0,9 M de sal para hibridación a 42 °C, y al menos aproximadamente 0,1 M a al menos aproximadamente 0,2 M de sal para lavado a 55 °C. Las condiciones de rigurosidad media también pueden incluir albúmina de suero bovino (BSA) al 1 %, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7 % para hibridación a 65 °C y (i) 2 × SSC, SDS al 0,1 %; o (ii) BSA al 0,5 %, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM (pH 7,2), SDS al 5 % para lavado a 60-65 °C. Una realización de la presente descripción de las condiciones de rigurosidad media incluye la hibridación en 6 x SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % a 60 °C. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen y abarcan desde al menos aproximadamente el 31 % v/v hasta al menos aproximadamente el 50 % v/v de formamida y desde aproximadamente 0,01 M hasta aproximadamente 0,15 M de sal para la hibridación a 42 °C y aproximadamente 0,01 M hasta aproximadamente 0,02 M de sal para el lavado a

55 °C.

Las condiciones de alta rigurosidad también pueden incluir BSA al 1 %, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7 % para hibridación a 65 °C y (i) 0,2 x SSC, SDS al 0,1 %; o (ii) BSA al 0,5 %, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM (pH 7,2), SDS al 1 % para lavado a una temperatura superior a 65 °C. Una realización de la presente descripción de condiciones de alta rigurosidad incluye la hibridación en 6 x SSC a aproximadamente 45 °C, seguida de uno o más lavados en 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C. Una realización de la presente descripción de condiciones de muy alta rigurosidad incluyen la hibridación en fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7 % a 65 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2 x SSC, SDS al 1 % a 65 °C.

10

Otras condiciones de rigurosidad son bien conocidas en la técnica y un experto en la materia reconocerá que pueden manipularse diversos factores para optimizar la especificidad de la hibridación. La optimización de la rigurosidad de los lavados finales puede servir para garantizar un alto grado de hibridación. Para ejemplos detallados, véase Ausubel y col., mencionado anteriormente en las páginas 2.10.1 a 2.10.16 y Sambrook y col. (1989, mencionado anteriormente) en las secciones 1.101 a 1.104. Mientras que los lavados rigurosos se realizan típicamente a temperaturas de aproximadamente 42 °C a 68 °C, un experto en la materia apreciará que otras temperaturas pueden ser adecuadas para condiciones rigurosas. La tasa máxima de hibridación se produce típicamente entre aproximadamente 20 °C y 25 °C por debajo de la T_m para la formación de un híbrido de ADN-ADN. Es bien conocido en la técnica que la T_m es la temperatura de fusión, o la temperatura a la que se disocian dos secuencias de polinucleótidos complementarias. Los procedimientos para estimar la T_m son bien conocidos en la técnica (véase Ausubel y col., mencionado anteriormente, en la página 2.10.8).

En general, la T_m de un dúplex de ADN perfectamente emparejado se puede predecir como una aproximación mediante la fórmula: $T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10} M) + 0,41 (\% \text{ de G+C}) - 0,63 (\% \text{ de formamida}) - (600/\text{longitud})$ donde: M es la concentración de Na⁺, preferentemente en el intervalo de 0,01 molar a 0,4 molar; % de G+C es la suma de las bases de guanosina y citosina como porcentaje del número total de bases, dentro del intervalo entre el 30 % y el 75 % de G+C; % de formamida es el porcentaje de concentración de formamida por volumen; longitud es el número de pares de bases en el dúplex de ADN. La T_m de un ADN dúplex disminuye en aproximadamente 1 °C con cada aumento del 1 % en el número de pares de bases con falta de coincidencia aleatoria. El lavado se realiza generalmente a T_m - 15 °C para una rigurosidad alta, o T_m - 30 °C para una rigurosidad moderada.

En un ejemplo de un procedimiento de hibridación, una membrana (por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa o una membrana de nylon) que contiene ADN inmovilizado se hibrida durante una noche a 42 °C en un tampón de hibridación (formamida desionizada al 50 %, 5 x SSC, 5 x solución de Denhardt (ficoll al 0,1 %, polivinilpirrolidona al 0,1 % y albúmina de suero bovino al 0,1 %), SDS al 0,1 % y 200 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado que contiene una sonda etiquetada. La membrana se somete a continuación a dos lavados secuenciales a rigurosidad media (es decir, 2 x SSC, SDS al 0,1 % durante 15 min a 45 °C, seguido de 2 x SSC, SDS al 0,1 % durante 15 min a 50 °C), seguido de dos lavados secuenciales a mayor rigurosidad (es decir, 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % durante 12 min a 55 °C, seguido de 0,2 x SSC y solución de SDS al 0,1 % durante 12 min a 65-68 °C).

Producción de polipéptidos de HRS y conjugados HRS-Fc

Los polipéptidos conjugados HRS-Fc pueden prepararse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante el uso de síntesis de péptidos en fase sólida estándar (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154 (1963)), o mediante tecnología recombinante usando un huésped modificado genéticamente. La síntesis de proteínas se puede realizar usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada se puede conseguir, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer). Como alternativa, varios fragmentos pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando procedimientos químicos para producir la molécula deseada.

Los conjugados HRS-Fc también pueden producirse expresando una secuencia de ADN o ARN que codifica el polipéptido de HRS o los conjugados HRS-Fc en cuestión en una célula huésped adecuada mediante técnicas bien conocidas. La secuencia de polinucleótidos que codifica el conjugado HRS-Fc o el polipéptido de HRS puede prepararse sintéticamente mediante procedimientos estándar establecidos, por ejemplo, el procedimiento de la fosforamidita descrito por Beaucage y col., *Tetrahedron Letters* 22: 1859-1869, 1981; o el procedimiento descrito por Matthes y col., *EMBO Journal* 3: 801-805, 1984. De acuerdo con el procedimiento de la fosforamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, se purifican, se duplexan y se ligan para formar la construcción sintética de ADN. Como alternativa, la construcción de ADN o ARN puede construirse usando técnicas estándar de biología molecular recombinante que incluyen la clonación mediada por

enzimas de restricción y la amplificación de genes basada en PCR. En algunas realizaciones de la presente descripción para la expresión directa mediada por ARNm, el polinucleótido puede encapsularse en una nanopartícula o liposoma para permitir un suministro y captación eficientes en la célula, y opcionalmente incluir una estructura de casquete o cola modificada para mejorar la estabilidad y la traducción.

5

Las secuencias de polinucleótidos también pueden ser de genómica mixta, ADNc, ARN y una de origen sintético. Por ejemplo, una secuencia genómica o de ADNc que codifica un péptido líder puede unirse a una secuencia genómica o de ADNc que codifica el polipéptido de HRS o el conjugado HRS-Fc, después de lo cual la secuencia de ADN o ARN puede modificarse en un sitio insertando oligonucleótidos sintéticos que codifican la secuencia de aminoácidos deseada para recombinación homóloga de acuerdo con procedimientos bien conocidos o, preferentemente, generando la secuencia deseada mediante PCR usando oligonucleótidos adecuados. En algunas realizaciones de la presente descripción, se puede incluir una secuencia señal antes de la secuencia codificante. Esta secuencia codifica un péptido señal N-terminal a la secuencia codificante que se comunica con la célula huésped para dirigir el polipéptido a la superficie celular o secretar el polipéptido al medio. Típicamente, la célula huésped corta el péptido señal antes de que la proteína salga de la célula. Los péptidos señal se pueden encontrar en diversas proteínas en procariotas y eucariotas.

Se conocen diversos sistemas de vector de expresión/huésped y pueden utilizarse para contener y expresar secuencias de polinucleótidos. Estos incluyen, aunque sin limitarse a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófagos recombinantes, plásmidos o cósmidos; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas celulares vegetales transformados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales, incluyendo células de mamíferos y más específicamente sistemas de células humanas transformadas con vectores de expresión virales, plasmídicos, episomales o integradores.

Los «elementos de control» o las «secuencias reguladoras» presentes en un vector de expresión son regiones no traducidas del vector—potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3'—que interactúan con las proteínas celulares del huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Dichos elementos pueden variar en su potencia y especificidad. Dependiendo del sistema de vectores y del huésped utilizado, pueden usarse cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles como el promotor lacZ híbrido del fagémido PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, California) o el plásmido PSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) y similares. En sistemas celulares de mamíferos, generalmente se prefieren los promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Si es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, los vectores basados en SV40 o EBV pueden usarse ventajosamente con un marcador seleccionable apropiado.

Ciertas realizaciones de la presente descripción pueden emplear sistemas de expresión basados en *E. coli* (véase, por ejemplo, Structural Genomics Consortium y col., *Nature Methods*. 5: 135-146, 2008). Estas y realizaciones relacionadas de la presente descripción pueden basarse parcial o totalmente en la clonación independiente de ligamiento (LIC) para producir un vector de expresión adecuado. En realizaciones específicas de la presente descripción, la expresión de proteínas puede controlarse mediante una ARN polimerasa T7 (por ejemplo, una serie de vectores pET), o vectores pET modificados con promotores alternativos, que incluyen, por ejemplo, el promotor TAC. Estas y otras realizaciones relacionadas de la presente descripción pueden utilizar la cepa huésped de expresión BL21 (DE3), un lisógeno λ DE3 de BL21 que soporta la expresión mediada por T7 y es deficiente en proteasas lon y ompT para mejorar la estabilidad de la proteína diana. También se incluyen las cepas huésped de expresión que portan los plásmidos que codifican los ARNt usados raramente en *E. coli*, tales como las cepas ROSETTA™ (DE3) y Rosetta 2 (DE3). En algunas realizaciones de la presente descripción, se pueden utilizar otras cepas de *E. coli*, incluyendo otras cepas de *E. coli* K-12 tales como W3110 (F-lambda-IN (rrnD-rrnE) 1 rph-1) y UT5600 (F, araC14, leuB6 (Am), secA206(aziR), lacY1, proC14, tsx67, Δ (ompTfepC)266, entA403, glnX44(AS), λ -, trpE38, rfbC1, rpsL109(strR), xylA5, mtl-1, thiE1), lo que puede dar como resultado niveles reducidos de modificaciones postraduccionales durante la fermentación. La lisis celular y el manejo de la muestra también se pueden mejorar usando los reactivos comercializados con las marcas registradas nucleasa BENZONASE® y reactivo de extracción de proteínas BUGBUSTER®. Para el cultivo celular, los medios autoinductores pueden mejorar la eficiencia de muchos sistemas de expresión, incluyendo los sistemas de expresión de alto rendimiento. Los medios de este tipo (por ejemplo, el sistema de autoinducción OVERNIGHT EXPRESS™) provocan gradualmente la expresión de proteínas a través del cambio metabólico sin la adición de agentes inductores artificiales tales como IPTG.

Las realizaciones particulares de la presente descripción emplean etiquetas de hexahistidina (tales como las comercializadas con la marca registrada HIS•TAG®), seguidas de la purificación mediante cromatografía por afinidad metálica inmovilizada (IMAC), o técnicas relacionadas. Sin embargo, en ciertos aspectos de la presente descripción, las proteínas de grado clínico se pueden aislar de cuerpos de inclusión de *E. coli*, con o sin el uso de marcas de afinidad (véase, por ejemplo, Shimp y col., *Protein Expr Purif.* 50: 58-67, 2006). Como un ejemplo adicional, ciertas realizaciones de la presente descripción pueden emplear un sistema de producción de alto rendimiento de *E. coli* inducido por choque de frío, porque la sobreexpresión de proteínas en *Escherichia coli* a baja temperatura mejora su solubilidad y estabilidad (véase, por ejemplo, Qing y col., *Nature Biotechnology.* 22: 877-882, 2004).

También se incluyen sistemas de fermentación bacteriana de alta densidad. Por ejemplo, el cultivo de alta densidad celular de *Ralstonia eutropha* permite la producción de proteínas a densidades celulares de más de 150 g/l, y la expresión de proteínas recombinantes a títulos que superan 10 g/l. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden usar una serie de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles, tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH. Para revisiones, véase Ausubel y col. (mencionado anteriormente) y Grant y col., *Methods Enzymol.* 153: 516-544, 1987. También se incluyen los sistemas de expresión de *Pichia pandoris* (véase, por ejemplo, Li y col., *Nature Biotechnology.* 24, 210-215, 2006; y Hamilton y col., *Science*, 301: 1244, 2003). Ciertas realizaciones de la presente descripción incluyen sistemas de levadura que están diseñados para glucosilar selectivamente proteínas, incluyendo levaduras que tienen vías de N-glucosilación humanizadas, entre otras (véase, por ejemplo, Hamilton y col., *Science.* 313: 1441-1443, 2006; Wildt y col., *Nature Reviews Microbiol.* 3: 119-28, 2005; y Gerngross y col., *Nature-Biotechnology.* 22: 1409-1414, 2004; patentes de Estados Unidos N.º 7.629.163; 7.326.681; y 7.029.872). Simplemente a modo de ejemplo, los cultivos de levadura recombinante se pueden cultivar en matrices Fernbach o en fermentadores de 15 l, 50 l, 100 l y 200 l, entre otros.

En casos en que se usan vectores de expresión de plantas, la expresión de secuencias que codifican polipéptidos puede ser impulsada por cualquiera de una serie de promotores. Por ejemplo, promotores virales tales como los promotores 35S y 19S de CaMV se pueden usar solos o en combinación con la secuencia líder omega de TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 6: 307-311, 1987). Como alternativa, se pueden usar promotores de plantas tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o promotores por choque térmico (Coruzzi y col., *EMBO J.* 3: 1671-1680, 1984; Broglie y col., *Science.* 224: 838-843, 1984; y Winter y col., *Results Probl. Cell Differ.* 17: 85-105, 1991). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales mediante transformación directa de ADN o transfección mediada por patógenos. Dichas técnicas se describen en una serie de revisiones generalmente disponibles (véase, por ejemplo, Hobbs en McGraw Hill, *Yearbook of Science and Technology*, págs. 191-196, 1992).

También se puede usar un sistema de insectos para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en un sistema de este tipo, el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa como un vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en células de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el polipéptido pueden clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de la polihedrina, y colocarse bajo el control del promotor de la polihedrina. La inserción exitosa de la secuencia que codifica el polipéptido hará que el gen de la polihedrina sea inactivo y produzca un virus recombinante que carezca de proteína de la cubierta. Los virus recombinantes se pueden usar para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o células de *Trichoplusia* donde se puede expresar el polipéptido de interés (Engelhard y col., *PNAS EE. UU.* 91: 3224-3227, 1994). También se incluyen los sistemas de expresión de baculovirus, incluidos los que utilizan células SF9, SF21 y *T. ni* (véase, por ejemplo, Murphy y Pivnicka-Worms, *Curr Protoc Protein Sci.* Capítulo 5: Unidad 5.4, 2001). Los sistemas de insectos pueden proporcionar modificaciones postraduccionales que son similares a los sistemas de mamíferos.

En células huésped de mamífero, una serie de sistemas de expresión son bien conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado. Los sistemas de vectores de mamíferos ejemplares incluyen, por ejemplo, pCEP4, pREP4 y pREP7 de Invitrogen, el sistema PerC6 de Crucell y sistemas basados en lentivirus tales como pLP1 de Invitrogen y otros. Por ejemplo, en casos donde se usa un adenovirus como vector de expresión, las secuencias que codifican un polipéptido de interés pueden ligarse en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. La inserción en una región no esencial E1 o E3 del genoma viral se puede usar para obtener un virus viable que sea capaz de expresar el polipéptido en células huésped infectadas (Logan & Shenk, *PNAS EE. UU.* 81: 3655-3659, 1984). Además, los potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV), se pueden usar para aumentar la expresión en células huésped de mamíferos.

Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada

- por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen Virol.* 36: 59, 1977); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata de Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68, 1982); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas celulares huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células DHFR-CHO (Urlaub y col., *PNAS EE. UU.* 77: 4216, 1980); y líneas celulares de mieloma tales como NSO y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B. K.C Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), págs. 255-268. Ciertos sistemas de expresión de células de mamífero preferidos incluyen sistemas de expresión basados en células CHO y HEK293. Los sistemas de expresión de mamíferos pueden utilizar líneas celulares adjuntas, por ejemplo, en matraces T, frascos de cultivo rotatorios o fábricas celulares, o cultivos en suspensión, por ejemplo, en matraces de agitación de 1 l y 5 l, biorreactores con tanque de agitación de 5 l, 14 l, 40 l, 100 l y 200 l. o biorreactores WAVE de 20/50 l y 100/200 l, entre otros conocidos en la técnica.
- 20 También se incluyen procedimientos de expresión de proteínas libres de células. Estas y otras realizaciones relacionadas de la presente descripción utilizan típicamente ARN polimerasa purificada, ribosomas, ARNt y ribonucleótidos. Dichos reactivos pueden producirse, por ejemplo, por extracción a partir de células o a partir de un sistema de expresión basado en células.
- 25 Además, se puede seleccionar una cepa de células huésped por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Dichas modificaciones del polipéptido incluyen, aunque sin limitarse a, modificaciones postraduccionales tales como acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación, o la inserción de aminoácidos de origen no natural (véase, en general, las patentes de Estados Unidos N.º 7.939.496 7.816.320; 7.947.473; 7.883.866; 7.838.265; 7.829.310; 7.820.766; 7.820.766; 7.773.226, 7.736.872; 7.638.299; 7.632.924; y 7.230.068). En algunas realizaciones de la presente descripción, dichos aminoácidos de origen no natural pueden insertarse en la posición Cys130. El procesamiento postraducciona que escinde una forma «prepro» de la proteína también se puede usar para facilitar la inserción, el plegamiento y/o la función correctos. Se pueden seleccionar diferentes células huésped tales como levadura, CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y W138, además de las células bacterianas, que tienen o incluso carecen de maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales, para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña.

- Los polipéptidos de HRS o conjugados HRS-Fc producidos por una célula recombinante pueden purificarse y caracterizarse de acuerdo con diversas técnicas conocidas en la técnica. Los sistemas ejemplares para realizar la purificación de proteínas y analizar la pureza de proteínas incluyen cromatografía de líquidos de proteína rápida (FPLC) (por ejemplo, sistemas AKTA de AKTA y Bio-Rad), cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) (por ejemplo, HPLC de Beckman y Waters). Químicas ejemplares para la purificación incluyen cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, Q, S), cromatografía de exclusión por tamaño, gradientes de sal, purificación por afinidad (por ejemplo, Ni, Co, FLAG, maltosa, glutatión, proteína A/G), filtración en gel, fase inversa, cromatografía de intercambio iónico HYPERD® de cerámica y columnas de interacción hidrófoba (HIC), entre otras conocidas en la técnica. Varios procedimientos ejemplares también se describen en las secciones de ejemplares.

Conjugados HRS-Fc

- 50 Como se señaló anteriormente, las realizaciones de la presente descripción se refieren a conjugados HRS-Fc, que comprenden al menos una región Fc que está unida covalentemente a uno o más polipéptidos de HRS. Los ejemplos de conjugados HRS-Fc incluyen proteínas de fusión y diversas formas de proteínas reticuladas químicamente. Se puede emplear una amplia variedad de secuencias de la región Fc en los conjugados HRS-Fc de la presente descripción, incluyendo secuencias de tipo silvestre de cualquier número de especies, así como variantes, fragmentos, híbridos y formas químicamente modificadas de las mismas. Los polipéptidos de HRS-Fc también pueden comprender (opcionalmente) uno o más enlazadores, que típicamente separan la o las regiones Fc del o de los polipéptidos de HRS, incluyendo enlazadores peptídicos y enlazadores químicos, como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica. Se apreciará que, en cualquiera de estos conjugados HRS-Fc, el aminoácido N o C terminal nativo de los polipéptidos de HRS, o el aminoácido N o C nativo en el dominio Fc, puede ser eliminado y/o reemplazado con uno o más aminoácidos no nativos, por ejemplo, para facilitar la expresión y/o la

clonación o para servir como una secuencia enlazadora entre las dos proteínas.

Los polipéptidos de conjugados HRS-Fc pueden proporcionar diversas ventajas con respecto a los polipéptidos de HRS no conjugados o no modificados, por ejemplo, los polipéptidos de HRS correspondientes de la misma secuencia o secuencia similar que no tienen una o más regiones Fc unidas a ellos. Simplemente a modo de ilustración, la unión covalente de una o más regiones Fc puede alterar (por ejemplo, aumentar, disminuir) la solubilidad, la semivida (por ejemplo, en suero, en un tejido seleccionado, en un tubo de ensayo en condiciones de almacenamiento, por ejemplo, a temperatura ambiente o en refrigeración), las propiedades de dimerización o multimerización, la actividad o actividades biológicas del polipéptido de HRS, por ejemplo, proporcionando funciones efectoras asociadas a la región Fc (por ejemplo, activación de la cascada clásica del complemento, interacción con células efectoras inmunitarias mediante el receptor de Fc (FcR), compartimentación de inmunoglobulinas), captación celular, transporte intracelular, distribución tisular y/o biodisponibilidad, con respecto a un polipéptido de HRS no modificado que tiene la misma secuencia o similar. En ciertos aspectos de la presente descripción, las regiones Fc pueden conferir funciones efectoras relacionadas con citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), que se cree que desempeñan un papel en el aclaramiento de células diana específicas, tales como células tumorales y células infectadas.

Ciertas realizaciones de la presente descripción emplean proteínas de fusión HRS-Fc. Las «proteínas de fusión» se definen en otra parte en el presente documento y son bien conocidas en la técnica, como lo son procedimientos para elaborar proteínas de fusión (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.116.964; 5.428.130; 5.455.165; 5.514.582; 6.406.697; 6.291.212; y 6.300.099 para descripción general y procedimientos relacionados con las proteínas de fusión Fc). En una proteína de fusión HRS-Fc, la región Fc puede fusionarse con el extremo N del polipéptido de HRS, el extremo C, o ambos. En algunas realizaciones de la presente descripción, una o más regiones Fc pueden fusionarse internamente con respecto a las secuencias de HRS, por ejemplo, colocando una región Fc entre una primera secuencia de HRS (por ejemplo, dominio) y una segunda secuencia de HRS (por ejemplo, dominio), donde la primera secuencia de HRS se fusiona con el extremo N de la región Fc y la segunda secuencia de HRS se fusiona con el extremo C de la región Fc. En realizaciones específicas de la presente descripción, la primera y la segunda secuencias de HRS son idénticas. En otras realizaciones de la presente descripción, la primera y la segunda secuencias de HRS son diferentes (por ejemplo, incluyen diferentes dominios funcionales del polipéptido de HRS). Ciertas proteínas de fusión HRS-Fc también pueden incluir secuencias de proteínas heterólogas adicionales, es decir, secuencias no de región Fc y no de polipéptido de HRS.

El término «HRS-Fc» puede indicar, pero no necesariamente indica, la unión N-terminal o C-terminal de la región Fc al polipéptido de HRS. Por ejemplo, en ciertos casos, el término «Fc-HRS» indica la fusión de la región Fc con el extremo N del polipéptido de HRS, y el término «HRS-Fc» indica la fusión de la región Fc con el extremo C del polipéptido de HRS. Sin embargo, cualquiera de los dos términos puede usarse más generalmente para referirse a cualquier proteína de fusión o conjugado de una región Fc y un polipéptido de HRS.

En algunas realizaciones de la presente descripción, las proteínas de fusión HRS-Fc pueden comprender copias repetidas en tándem del polipéptido de HRS acoplado a un único dominio Fc, opcionalmente separados por péptidos enlazadores. Las proteínas de fusión HRS-Fc repetidas en tándem ejemplares se proporcionan en la **tabla D10**. La preparación y las secuencias para conjugados HRS-Fc específicos repetidos en tándem se ilustran en los ejemplos.

Tabla D10	
Conjugados HRS-Fc en tándem ejemplares	
Polipéptido de HRS-L-polipéptido-HRS-L-Fc	
Polipéptido-HRS-L-polipéptido-HRS-L-polipéptido-HRS-L-Fc	
Polipéptido-HRS-L-polipéptido-HRS-L-polipéptido-HRS-L-polipéptido-HRS-L-Fc	
Fc-L-polipéptido-HRS-L-polipéptido-HRS	
Fc-L-polipéptido-HRS-L-HRS-L-polipéptido-HRS	
Fc-L-polipéptido-HRS-L-HRS-L-HRS-L-polipéptido-HRS	
Donde:	
«Fc» es un dominio Fc como se describe en el presente documento.	
«polipéptido-HRS» es cualquiera de los polipéptidos de HRS truncados descritos en la tabla D5 .	
«L» es un enlazador peptídico opcional.	

Ciertas realizaciones de la presente descripción se refieren a conjugados HRS-Fc, donde, por ejemplo, una o más regiones Fc están conjugadas químicamente o reticuladas con el o los polipéptidos de HRS. En estos y en aspectos

relacionados de la presente descripción, la región Fc puede conjugarse al polipéptido HRS en la región N-terminal (por ejemplo, dentro de los primeros 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 aminoácidos más o menos), la región interna (entre las regiones N-terminal y C-terminal), y/o la región C-terminal (por ejemplo, dentro de los últimos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 aminoácidos más o menos). Los polipéptidos se pueden conjugar o reticular con otros polipéptidos de acuerdo con diversas técnicas de rutina en la técnica. Por ejemplo, ciertas técnicas emplean el reticulador de carbodiimida reactivo con carboxilo EDC (o EDAC), que se une covalentemente a través de los grupos carboxilo D, E y C-terminales. Otras técnicas emplean EDC activado, que se une covalentemente a través de los grupos amino K y N-terminal). Todavía otras técnicas emplean el éster de *m*-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida (MBS) o Sulfo-MBS, que se unen covalentemente mediante el grupo tiol de un residuo de cisteína (véase también la solicitud de Estados Unidos N.º 2007/0092940 para regiones de Ig diseñadas con cisteína que pueden usarse para la conjugación de tiol). Dichas proteínas reticuladas también pueden comprender enlazadores, incluyendo enlazadores escindibles o liberables de otro modo (por ejemplo, enlazadores escindibles enzimáticamente, enlazadores hidrolizables), y enlazadores no escindibles (es decir, enlazadores fisiológicamente estables). Ciertas realizaciones de la presente descripción pueden emplear polímeros no peptídicos (por ejemplo, polímeros de PEG; conjugado HRS-N-PEG-N-Fc) como un reticulador entre la o las regiones Fc y el o los polipéptidos de HRS, como se describe, por ejemplo, en la solicitud de Estados Unidos N.º 2006/0269553. Véase también la solicitud de Estados Unidos N.º 2007/0269369 para descripciones ejemplares de los sitios de conjugación de la región Fc.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, descritas con mayor detalle a continuación, pueden emplearse regiones Fc variantes o modificadas de otra manera, incluyendo aquellas que tienen propiedades o actividades biológicas alteradas con respecto a la o las regiones Fc de tipo silvestre. Los ejemplos de regiones Fc modificadas incluyen aquellas que tienen secuencias mutadas, por ejemplo, por sustitución, inserción, eliminación o truncamiento de uno o más aminoácidos con respecto a una secuencia de tipo silvestre, polipéptidos Fc híbridos compuestos por dominios de diferentes clases/subclases de inmunoglobulina, polipéptidos Fc que tienen patrones de glucosilación/sialilación alterados y polipéptidos Fc que se modifican o derivan, por ejemplo, por biotinylation (véase, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos N.º 2010/0209424), fosforilación, sulfatación, etc., o cualquier combinación de las anteriores. Dichas modificaciones pueden emplearse para alterar (por ejemplo, aumentar, disminuir) las propiedades de unión de la región Fc a uno o más FcR particulares (por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa, FcγRIIb, FcRn), sus propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, estabilidad o semivida, biodisponibilidad, distribución tisular, volumen de distribución, concentración, constante de velocidad de eliminación, velocidad de eliminación, área bajo la curva (AUC), aclaramiento, C_{max}, t_{max}, C_{min}, fluctuación), su inmunogenicidad, su fijación o activación del complemento, y/o las actividades relacionadas con CDC/ADCC/ADCP de la región Fc, entre otras propiedades descritas en el presente documento, con respecto a una secuencia Fc de tipo silvestre correspondiente.

La «región Fc» de un conjugado HRS-Fc que proporcionada en el presente documento se deriva habitualmente de la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina (Ig). Una molécula de Ig típica está compuesta por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las cadenas pesadas se pueden dividir en al menos tres regiones funcionales: la región Fd, la región Fc (región cristalizante del fragmento) y la región bisagra (véase la **figura 1**), encontrándose esta última solo en inmunoglobulinas IgG, IgA e IgD. La región Fd comprende los dominios variable (V_H) y constante (C_{H1}) de las cadenas pesadas y, junto con los dominios variable (V_L) y constante (C_L) de las cadenas ligeras, forma el fragmento de unión al antígeno o la región Fab.

La región Fc de las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgD comprende los dominios constantes de cadena pesada 2 y 3, designados respectivamente como regiones CH₂ y CH₃; y la región Fc de las inmunoglobulinas IgE e IgM comprende los dominios constantes de cadena pesada 2, 3 y 4, designados respectivamente como regiones CH₂, CH₃ y CH₄. La región Fc es la principal responsable de las funciones efectoras de la inmunoglobulina, que incluyen, por ejemplo, fijación del complemento y unión a los receptores Fc análogos de células efectoras.

La región bisagra (descubierta en IgG, IgA e IgD) actúa como un espaciador flexible que permite que la parte Fab se mueva libremente en el espacio con respecto a la región Fc. En contraste con las regiones constantes, las regiones bisagra son estructuralmente diversas, variando tanto en secuencia como en longitud entre las clases y subclases de inmunoglobulina. La región bisagra también puede contener uno o más sitios de glucosilación, que incluyen varios tipos de sitios estructuralmente distintos para la unión de carbohidratos. Por ejemplo, la IgA1 contiene cinco sitios de glucosilación dentro de un segmento de 17 aminoácidos de la región bisagra, lo que confiere una resistencia significativa del polipéptido de la región bisagra a las proteasas intestinales. Los residuos en la región proximal de la bisagra del dominio CH₂ también pueden influir en la especificidad de la interacción entre una inmunoglobulina y su o sus receptores de Fc respectivos (véase, por ejemplo, Shin y col., *Intern. Rev. Immunol.* 10: 177-186, 1993).

La expresión «región Fc» o «fragmento Fc» o «Fc», como se usa en el presente documento, se refiere a una

proteína que contiene una o más de una región CH₂, una región CH₃ y/o una región CH₄ de una o más inmunoglobulinas seleccionadas, incluyendo fragmentos y variantes y combinaciones de los mismos. Una «región Fc» también puede incluir una o más regiones bisagra de la región constante de cadena pesada de una inmunoglobulina. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la región Fc no contiene una o más de las regiones CH₁, CL, VL y/o VH de una inmunoglobulina.

La región Fc puede derivarse de la región CH₂, la región CH₃, la región CH₄ y/o la o las regiones bisagra de una cualquiera o más de las clases de inmunoglobulina, incluyendo aunque sin limitarse a IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, incluyendo las subclases y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones de la presente descripción, la región Fc se deriva de una inmunoglobulina IgA, incluyendo las subclases IgA1 y/o IgA2. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la región Fc se deriva de una inmunoglobulina IgD. En realizaciones particulares de la presente descripción, la región Fc se deriva de una inmunoglobulina IgE. En algunas realizaciones de la presente descripción, la región Fc se deriva de una inmunoglobulina IgG, incluyendo las subclases IgG1, IgG2, IgG2, IgG3 y/o IgG4. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la región Fc se deriva de una inmunoglobulina IgM. La **figura 2** muestra un alineamiento de regiones Fc de IgA1 (SEQ ID NO:156), IgA2 (SEQ ID NO:157), IgM (SEQ ID NO:158), IgG1 (SEQ ID NO:159), IgG2 (SEQ ID NO:160), IgG3 (SEQ ID NO:161), IgG4 (SEQ ID NO:162) e IgE (SEQ ID NO:163) humanas.

Ciertas regiones Fc demuestran una unión específica para uno o más receptores de Fc (FcR). Los ejemplos de clases de receptores de Fc incluyen receptores de Fc γ (Fc γ R), receptores de Fc α (Fc α R), receptores de Fc ϵ (Fc ϵ R) y el receptor de Fc neonatal (FcRn). Por ejemplo, ciertas regiones Fc tienen una mayor unión a (o afinidad por) uno o más Fc γ R, con respecto a Fc α R, Fc ϵ R y/o FcRn. En algunas realizaciones de la presente descripción, las regiones Fc tienen unión aumentada a Fc α R, con respecto a uno o más Fc γ R, Fc ϵ R y/o FcRn. En otras realizaciones de la presente descripción, las regiones Fc tienen unión aumentada a Fc ϵ R (por ejemplo, Fc α RI), con respecto a uno o más Fc γ R, Fc α R y/o FcRn. En realizaciones particulares de la presente descripción, las regiones Fc tienen unión aumentada a FcRn, con respecto a uno o más Fc γ R, Fc α R y/o Fc ϵ R. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la unión (o afinidad) de una región Fc a uno o más FcR seleccionados aumenta con respecto a su unión a (o afinidad por) uno o más FcR diferentes, típicamente en aproximadamente 1,5x, 2x, 2,5x, 3x, 3,5x, 4x, 4,5x, 5x, 6x, 7x, 9x, 10x, 15x, 20x, 25x, 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, 200x, 300x, 400x, 500x, 600x, 700x, 800x, 900x, 1000x o más (incluyendo todos los números enteros intermedios).

Los ejemplos de Fc γ R incluyen Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb. Fc γ RI (CD64) se expresa en macrófagos y células dendríticas y desempeña un papel en la fagocitosis, el estallido respiratorio, la estimulación de citocinas y el transporte endocítico de células dendríticas. La expresión de Fc γ RI está regulada por incremento tanto por GM-CSF como por el interferón γ (γ -IFN) y por la interleucina-4 (IL-4). Fc γ RIIa se expresa en leucocitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos, células dendríticas y mastocitos. Fc γ RIIa desempeña un papel en la fagocitosis, el estallido respiratorio y la estimulación de citocinas. La expresión de Fc γ RIIa está regulada positivamente por GM-CSF y γ -IFN, y es reducida por IL-4. Fc γ RIIb se expresa en linfocitos B, PMN, macrófagos y mastocitos. Fc γ RIIb inhibe las respuestas mediadas por el mecanismo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM) y, por lo tanto, es un receptor inhibidor. La expresión de Fc γ RIIc está regulada positivamente por la inmunoglobulina intravenosa (IVIG) e IL-4 y es reducida por γ -IFN. Fc γ RIIc se expresa en linfocitos NK. Fc γ RIIIa se expresa en linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos, mastocitos y plaquetas. Este receptor participa en la fagocitosis, el estallido respiratorio, la estimulación de citocinas, la agregación y la desgranulación de las plaquetas, y la ADCC mediada por NK. La expresión de Fc γ RIII está regulada positivamente por C5a, TGF- β y γ -IFN y está regulada negativamente por IL-4. Fc γ RIIIb es un receptor enlazado a GPI expresado en PMN.

Ciertas regiones Fc tienen unión aumentada a Fc γ RI, con respecto a Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa y/o Fc γ RIIIb. Algunas realizaciones de la presente descripción tienen unión aumentada a Fc γ RIIa, con respecto a Fc γ RI, Fc γ RIIb, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa y/o Fc γ RIIIb. Las regiones Fc particulares tienen unión aumentada a Fc γ RIIb, con respecto a Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa y/o Fc γ RIIIb. Ciertas regiones Fc tienen unión aumentada a Fc γ RIIc, con respecto a Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa y/o Fc γ RIIIb. Algunas regiones Fc tienen unión aumentada a Fc γ RIIIa, con respecto a Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIc y/o Fc γ RIIIb. Las regiones Fc específicas tienen unión aumentada a Fc γ RIIIb, con respecto a Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIc y/o Fc γ RIIIa.

Los Fc α R incluyen Fc α RI (CD89). El Fc α RI se encuentra en la superficie de neutrófilos, eosinófilos, monocitos, ciertos macrófagos (por ejemplo, células de Kupffer) y ciertas células dendríticas. El Fc α RI está compuesto por dos dominios extracelulares similares a Ig, es miembro tanto de la superfamilia de inmunoglobulinas como de la familia

del receptor de reconocimiento inmunitario de múltiples cadenas (MIRR), y constituye una señal al asociarse con dos cadenas de señalización de FcR γ .

Los Fc ϵ R incluyen Fc ϵ RI y Fc ϵ RII. El receptor de alta afinidad Fc ϵ RI es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, se expresa en células de Langerhans epidérmicas, eosinófilos, mastocitos y basófilos, y desempeña un papel fundamental en el control de las respuestas alérgicas. El Fc ϵ RI también se expresa en las células presentadoras de antígenos y regula la producción de citocinas proinflamatorias. El receptor de baja afinidad Fc ϵ RII (CD23) es una lectina de tipo C que puede funcionar como un receptor unido a la membrana o soluble. El Fc ϵ RII regula el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B, y bloquea la unión a IgE de eosinófilos, monocitos y basófilos. Ciertas regiones Fc tienen unión aumentada a Fc ϵ RI, con respecto a Fc ϵ RII. Otras regiones Fc tienen unión aumentada a Fc ϵ RII, con respecto a Fc ϵ RI.

La **tabla F1** a continuación resume las características de ciertos FcR.

Tabla F1 Receptores de Fc ejemplares				
Receptor	Ligando de anticuerpo primario	Afinidad al ligando	Distribución celular	Efectos ejemplares tras la unión al ligando de Fc
FcγRI (CD64)	IgG1 e IgG3	Alta (Kd $\sim 10^{-9}$ M)	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Células dendríticas	Fagocitosis Activación de células Activación del estallido respiratorio Inducción de la destrucción de microbios
FcγRIIa (CD32)	IgG	Baja (Kd $> 10^{-7}$ M)	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos Plaquetas Células de Langerhans	Fagocitosis Desgranulación (eosinófilos)
FcγRIIb1 (CD32)	IgG	Baja (Kd $> 10^{-7}$ M)	Linfocitos B Mastocitos	Sin fagocitosis Inhibición de la actividad celular
FcγRIIb2 (CD32)	IgG	Baja (Kd $> 10^{-7}$ M)	Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Fagocitosis Inhibición de la actividad celular
FcγRIIIa (CD16a)	IgG	Baja (Kd $> 10^{-6}$ M)	Linfocitos NK Macrófagos (ciertos tejidos)	Inducción de citotoxicidad mediada por células, dependiente de anticuerpos (ADCC) Inducción de la liberación de citocinas por macrófagos
FcγRIIIb (CD16b)	IgG	Baja (Kd $> 10^{-6}$ M)	Eosinófilos Macrófagos Neutrófilos Mastocitos Células dendríticas foliculares	Inducción de la destrucción de microbios
FcϵRI	IgE	Alta (Kd $\sim 10^{-10}$ M)	Mastocitos Eosinófilos Basófilos Células de Langerhans	Desgranulación
FcϵRII (CD23)	IgE	Baja (Kd $> 10^{-7}$ M)	Linfocitos B Eosinófilos Células de Langerhans	Posible molécula de adhesión

FcαRI (CD89)	IgA	Baja (Kd > 10 ⁻⁶ M)	Monocitos Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos	Fagocitosis Inducción de la destrucción de microbios
Fcα/μR	IgA and IgM	Alta para IgM, moderada para IgA	Linfocitos B Células mesangiales Macrófagos	Endocitosis Inducción de la destrucción de microbios
FcRn	IgG		Monocitos Macrófagos Células dendríticas Células epiteliales Células endoteliales Hepatocitos	Transfiere IgG desde una madre al lactante en la leche Transfiere IgG desde una madre al feto a través de la placenta Protege a la IgG de la degradación

Las regiones Fc pueden derivarse de las moléculas de inmunoglobulina de cualquier animal, incluyendo vertebrados tales como mamíferos, tales como vacas, cabras, cerdos, perros, ratones, conejos, hámsteres, ratas, cobayas, primates no humanos y seres humanos. Las secuencias de aminoácidos de las regiones CH₂, CH₃, CH₄ y bisagra de las inmunoglobulinas IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM humanas ejemplares de tipo silvestre se muestran a continuación (SEQ ID NO:128-154).

La SEQ ID NO:128 es la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgA1 humana (VPSTPPTPSPSTPPTSPSPS).

La SEQ ID NO:129 es la secuencia de aminoácidos de una región CH₂ de IgA1 humana (CCHPRLSLHRPALEDLLLGEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWN HGKTFTCTAAYPEKTPLTATLSKS).

La SEQ ID NO:130 es la secuencia de aminoácidos de una región CH₃ de IgA1 humana (GNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTTFAVTSILR VAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVM AEVDGTCY).

La SEQ ID NO:131 es la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgA2 humana (VPPPPP).

La SEQ ID NO:132 es la secuencia de aminoácidos de una región CH₂ de IgA2 humana (CCHPRLSLHRPALEDLLLGEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQPWN HGETFTCTAAHPELKTPLTANITKS).

La SEQ ID NO:133 es la secuencia de aminoácidos de una región CH₃ de IgA2 humana (GNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTTFAVTSILR VAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVM AEVDGTCY).

La SEQ ID NO:134 es la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgD humana (ESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEQEERETKTP).

La SEQ ID NO:135 es la secuencia de aminoácidos de una región CH₂ de IgD humana (ECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFWGSCLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLT LPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPQRLMALREP).

La SEQ ID NO:136 es la secuencia de aminoácidos de una región CH₃ de IgD humana (AAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPRSTTFWAWSVLRVP APPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDHGPMK).

La SEQ ID NO:137 es la secuencia de aminoácidos de una región CH₂ de IgE humana (VCSRDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTLS QKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCA).

La SEQ ID NO:138 es la secuencia de aminoácidos de una región CH3 de IgE humana (DSNPRGV SAYLSRPSFDL FIRKSPTITCLVVDLAPSKGTVNLWSRASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGT RDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRSTTKTS).

5

La SEQ ID NO:139 es la secuencia de aminoácidos de una región CH4 de IgE humana (GPRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHNEVQLPDARHSTTQPRKTKGSGFFVFSRLEVTR AEWEQKDEFICRAVHEAASPSQTVQRAVSVNPGK).

10 La SEQ ID NO:140 es la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG1 humana (EPKSCDKTHTCPPCP).

La SEQ ID NO:341 es la secuencia de aminoácidos de una secuencia derivada de una región bisagra de IgG1 humana modificada (SDKTHTCPPCP).

15

La SEQ ID NO:141 es la secuencia de aminoácidos de una región CH2 de IgG1 humana (APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK).

20 La SEQ ID NO:142 es la secuencia de aminoácidos de una región CH3 de IgG1 humana (GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK).

La SEQ ID NO:342 es la secuencia de aminoácidos de una secuencia de cadena pesada de IgG1 humana
25 (MSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLT VHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK) . Se apreciará que el residuo de Met en esta secuencia de la cadena pesada de IgG1 humana se puede eliminar, por ejemplo, tras la fusión N-terminal a un polipéptido de HRS (véase la SEQ ID NO:340).

30

La SEQ ID NO:143 es la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG2 humana (ERKCCVECPGPCP).

La SEQ ID NO:144 es la secuencia de aminoácidos de una región CH2 de IgG2 humana (APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVSLTV
35 VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK).

La SEQ ID NO:145 es la secuencia de aminoácidos de una región CH3 de IgG2 humana (GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK).

40

La SEQ ID NO:146 es la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG3 humana (ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP).

La SEQ ID NO:147 es la secuencia de aminoácidos de una región CH2 de IgG3 humana
45 (APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVSLT VHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK).

La SEQ ID NO:148 es la secuencia de aminoácidos de una región CH3 de IgG3 humana (GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
50 WQQGNIFSCSVMEALHNFTQKSLSLSPGK).

La SEQ ID NO:149 es la secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG4 humana (ESKYGPPCPSCP).

La SEQ ID NO:150 es la secuencia de aminoácidos de una región CH2 de IgG4 humana
55 (APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK).

La SEQ ID NO:151 es la secuencia de aminoácidos de una región CH3 de IgG4 humana (GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLSDGSFFLYSRLTVDKSR
60 WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK).

La SEQ ID NO:152 es la secuencia de aminoácidos de una región CH2 de IgM humana (VIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVP).

5

La SEQ ID NO:153 es la secuencia de aminoácidos de una región CH3 de IgM humana (DQDTAIRVFAIPPSFASIFLTkSTKLtCLVTDLTtYDSVTISWTRQNGEAVKtHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNsGERFTCTVtHTDLPSPLKQTISRPK).

10 La SEQ ID NO:154 es la secuencia de aminoácidos de una región CH4 de IgM humana (GVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVfVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILT VSEEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVtERTVDKSTGKPTLYNVSLVM SDTAGTCY).

Un conjugado HRS-Fc de la presente descripción puede, por lo tanto, comprender, consistir en, o consistir esencialmente en una o más de las secuencias de aminoácidos de la región Fc humana de las SEQ ID NO:128-163 o 339-342, incluyendo variantes, fragmentos, homólogos, ortólogos, parálogos, y combinaciones de las mismas. Ciertas realizaciones ilustrativas de la presente descripción comprenden una región Fc que varía en tamaño desde aproximadamente 20-50, 20-100, 20-150, 20-200, 20-250, 20-300, 20-400, 50-100, 50-150, 50-200, 50-250, 50-300, 50-400, 100-150, 100-200, 100-250, 100-300, 100-350, 100-400, 200-250, 200-300, 200-350, o 200-400 aminoácidos de longitud, y opcionalmente comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una o más de las SEQ ID NO:128-154 o 341-342. Ciertas realizaciones de la presente descripción comprenden una región Fc de hasta aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400 o más aminoácidos, que opcionalmente comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una o más de las SEQ ID NO:128-154 o 339-342.

25

Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en secuencias de IgA1 humana expuestas en las SEQ ID NO:128-130 o 156, en cualquier orden leyendo desde el extremo N hasta el extremo C, incluyendo combinaciones de las mismas (por ejemplo, las SEQ ID NO:128 y 129 y 130, las SEQ ID NO:128 y 129; las SEQ ID NO:128 y 130; las SEQ ID NO:129 y 130), y variantes y fragmentos de las mismas. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgA1 humana expuesta en la SEQ ID NO:128. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgA1 humana expuesta en la SEQ ID NO:129. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgA1 humana expuesta en la SEQ ID NO:130.

35 Algunas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en secuencias de IgA2 humana expuestas en las SEQ ID NO:131-133 o 157, en cualquier orden leyendo desde el extremo N hasta el extremo C, incluyendo combinaciones de las mismas (por ejemplo, las SEQ ID NO:131 y 132 y 133, las SEQ ID NO:131 y 132; las SEQ ID NO:131 y 133; las SEQ ID NO:132 y 133), y variantes y fragmentos de las mismas. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgA2 humana expuesta en la SEQ ID NO:131. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgA2 humana expuesta en la SEQ ID NO:132. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgA2 humana expuesta en la SEQ ID NO:133.

Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en secuencias de IgD humanas expuestas en las SEQ ID NO:134-136, en cualquier orden leyendo desde el extremo N hasta el extremo C, incluyendo combinaciones de las mismas (por ejemplo, las SEQ ID NO:134 y 135 y 136, las SEQ ID NO:134 y 135; las SEQ ID NO:134 y 136; las SEQ ID NO:135 y 136), y variantes y fragmentos de estas secuencias y combinaciones. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgD humana expuesta en la SEQ ID NO:134. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgD humana expuesta en la SEQ ID NO:135. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgD humana expuesta en la SEQ ID NO:136.

Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en secuencia de IgE humana expuestas en las SEQ ID NO:137-139 o 163, en cualquier orden leyendo desde el extremo N hasta el extremo C, incluyendo combinaciones de las mismas (por ejemplo, las SEQ ID NO:137 y 138 y 139, las SEQ ID NO:137 y 138; la SEQ ID NO:137 y 139; las SEQ ID NO:138 y 139), y variantes y fragmentos de estas secuencias y combinaciones. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgE humana expuesta en la SEQ ID NO:137. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgE humana expuesta en la SEQ ID NO:138. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgE humana expuesta en la SEQ ID NO:139.

Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en secuencias de IgG1 humana expuestas en las SEQ ID NO:140-142 o 159 o 339-342, en cualquier orden leyendo desde el extremo N hasta el extremo C, incluyendo combinaciones de las mismas (por ejemplo, las SEQ ID NO:140 y 141 y 142, las SEQ ID NO:140 y 141; las SEQ ID NO:140 y 142; las SEQ ID NO:141 y 142), y variantes y fragmentos de estas secuencias y combinaciones. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG1 humana expuesta en la SEQ ID NO:140. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG1 humana expuesta en la SEQ ID NO:141. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG1 humana expuesta en la SEQ ID NO:142. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG1 humana expuesta en la SEQ ID NO:339. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG1 humana expuesta en la SEQ ID NO:340. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG1 humana expuesta en la SEQ ID NO:341. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG1 humana expuesta en la SEQ ID NO:342.

Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en secuencias de IgG2 humana expuestas en las SEQ ID NO:143-145 o 160, en cualquier orden leyendo desde el extremo N hasta el extremo C, incluyendo combinaciones de las mismas (por ejemplo, las SEQ ID NO:143 y 144 y 145, las SEQ ID NO:143 y 144; las SEQ ID NO:143 y 145; las SEQ ID NO:144 y 145), y variantes y fragmentos de estas secuencias y combinaciones. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG2 humana expuesta en la SEQ ID NO:143. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG2 humana expuesta en la SEQ ID NO:144. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG2 humana expuesta en la SEQ ID NO:145.

Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en secuencias de IgG3 humana expuestas en las SEQ ID NO:146-148 o 161, en cualquier orden leyendo desde el extremo N hasta el extremo C, incluyendo combinaciones de las mismas (por ejemplo, las SEQ ID NO:146 y 147 y 148, las SEQ ID NO:146 y 147; las SEQ ID NO:146 y 148; las SEQ ID NO:147 y 148), y variantes y fragmentos de estas secuencias y combinaciones. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG3 humana expuesta en la SEQ ID NO:146. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG3 humana expuesta en la SEQ ID NO:147. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG3 humana expuesta en la SEQ ID NO:148.

Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en secuencias de IgG4 humana expuestas en las SEQ ID NO:149-151 o 162, en cualquier orden leyendo desde el extremo N hasta el extremo C, incluyendo combinaciones de las mismas (por ejemplo, las SEQ ID NO:149 y 150 y 151, las SEQ ID NO:149 y 150; las SEQ ID NO:149 y 151; las SEQ ID NO:150 y 151), y variantes y fragmentos de estas secuencias y combinaciones. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG4 humana expuesta en la SEQ ID NO:149. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG4 humana expuesta en la SEQ ID NO:150. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgG4 humana expuesta en la SEQ ID NO:151.

Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en secuencias de IgM humana expuestas en las SEQ ID NO:152-154 o 158, en cualquier orden leyendo desde el extremo N hasta el extremo C, incluyendo combinaciones de las mismas (por ejemplo, las SEQ ID NO:152 y 153 y 154, las SEQ ID NO:152 y 153; las SEQ ID NO:152 y 154; las SEQ ID NO:153 y 154), y variantes y fragmentos de estas secuencias y combinaciones. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgM humana expuesta en la SEQ ID NO:152. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgM humana expuesta en la SEQ ID NO:153. Ciertas regiones Fc comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la secuencia de IgM humana expuesta en la SEQ ID NO:154.

Como se señaló anteriormente, ciertas realizaciones de la presente descripción emplean variantes, fragmentos, híbridos y/o formas modificadas de otra manera una región Fc descrita en el presente documento y conocida en la técnica (por ejemplo, las secuencias de Ig humana de las SEQ ID NO:128-163).

Se incluyen variantes que tienen una o más sustituciones, inserciones, eliminaciones y/o truncamientos de aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia, tal como una o más de las secuencias de referencia expuestas en las SEQ ID NO:128-163. En ciertas realizaciones de la presente descripción, una región Fc variante incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad con una o más de las secuencias de referencia.

75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o más de identidad o similitud u homología de secuencia con una o más de las SEQ ID NO:128-163. También se incluyen las regiones Fc que difieren de una o más de las SEQ ID NO:128-163 por la adición, eliminación, inserción o sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 o más aminoácidos. En ciertas realizaciones de la presente descripción, las adiciones o eliminaciones de aminoácidos se producen en el extremo C-terminal y/o el extremo N-terminal de la secuencia Fc de referencia.

En realizaciones particulares de la presente descripción, una región Fc variante comprende una secuencia de aminoácidos que puede alinearse de manera óptima con una cualquiera o más de las SEQ ID NO:128-163 para generar una puntuación (bit score) de BLAST o una puntuaciones de similitud de secuencia de al menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 o más, incluyendo todos los números enteros e intervalos intermedios, donde el alineamiento de BLAST usó la matriz BLOSUM62, una penalización de existencia de hueco de 11 y una penalización de extensión de hueco de 1.

También se incluyen regiones Fc híbridas, por ejemplo, regiones Fc que comprenden una combinación de dominios Fc (por ejemplo, bisagra, CH₂, CH₃, CH₄) de inmunoglobulinas de diferentes especies, diferentes clases de Ig y/o diferentes subclases de Ig. Los ejemplos generales incluyen regiones Fc híbridas que comprenden, consisten o consisten esencialmente en la siguiente combinación de dominios CH₂/CH₃: IgA1/IgA1, IgA1/IgA2, IgA1/IgD, IgA1/IgE, IgA1/IgG1, IgA1/IgG2, IgA1/IgG3, IgA1/IgG4, IgA1/IgM, IgA2/IgA1, IgA2/IgA2, IgA2/IgD, IgA2/IgE, IgA2/IgG1, IgA2/IgG2, IgA2/IgG3, IgA2/IgG4, IgA2/IgM, IgD/IgA1, IgD/IgA2, IgD/IgD, IgD/IgE, IgD/IgG1, IgD/IgG2, IgD/IgG3, IgD/IgG4, IgD/IgM, IgE/IgA1, IgE/IgA2, IgE/IgD, IgE/IgE, IgE/IgG1, IgE/IgG2, IgE/IgG3, IgE/IgG4, IgE/IgM, IgG1/IgA1, IgG1/IgA2, IgG1/IgD, IgG1/IgE, IgG1/IgG1, IgG1/IgG2, IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG1/IgM, IgG2/IgA1, IgG2/IgA2, IgG2/IgD, IgG2/IgE, IgG2/IgG1, IgG2/IgG2, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4, IgG2/IgM, IgG3/IgA1, IgG3/IgA2, IgG3/IgD, IgG3/IgE, IgG3/IgG1, IgG3/IgG2, IgG3/IgG3, IgG3/IgG4, IgG3/IgM, IgG4/IgA1, IgG4/IgA2, IgG4/IgD, IgG4/IgE, IgG4/IgG1, IgG4/IgG2, IgG4/IgG3, IgG4/IgG4, IgG4/IgM, IgM/IgA1, IgM/IgA2, IgM/IgD, IgM/IgE, IgM/IgG1, IgM/IgG2, IgM/IgG3, IgM/IgG4, IgM/IgM (o fragmentos o variantes de los mismos), e incluyen opcionalmente una bisagra de una o más de IgA1, IgA2, IgD, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, y/o un dominio CH₄ de IgE y/o IgM. En realizaciones específicas de la presente descripción, los dominios bisagra, CH₂, CH₃ y CH₄ son de Ig humana.

Los ejemplos adicionales incluyen regiones Fc híbridas que comprenden, consisten o consisten esencialmente en la siguiente combinación de dominios CH₂/CH₄: IgA1/IgE, IgA2/IgE, IgD/IgE, IgE/IgE, IgG1/IgE, IgG2/IgE, IgG3/IgE, IgG4/IgE, IgM/IgE, IgA1/IgM, IgA2/IgM, IgD/IgM, IgE/IgM, IgG1/IgM, IgG2/IgM, IgG3/IgM, IgG4/IgM, IgM/IgM (o fragmentos o variantes de los mismos), y opcionalmente incluyen una bisagra de una o más de IgA1, IgA2, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y/o un dominio CH₃ de una o más de IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM. En realizaciones específicas de la presente descripción, los dominios bisagra, CH₂, CH₃ y CH₄ son de Ig humana.

Ciertos ejemplos incluyen regiones Fc híbridas que comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la siguiente combinación de dominios CH₃/CH₄: IgA1/IgE, IgA2/IgE, IgD/IgE, IgE/IgE, IgG1/IgE, IgG2/IgE, IgG3/IgE, IgG4/IgE, IgM/IgE, IgA1/IgM, IgA2/IgM, IgD/IgM, IgE/IgM, IgG1/IgM, IgG2/IgM, IgG3/IgM, IgG4/IgM, IgM/IgM (o fragmentos o variantes de los mismos), y opcionalmente incluyen una bisagra de una o más de IgA1, IgA2, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y/o un dominio CH₂ de una o más de IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM. En realizaciones específicas de la presente descripción, los dominios bisagra, CH₂, CH₃ y CH₄ son de Ig humana.

Ejemplos particulares incluyen regiones Fc híbridas que comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la siguiente combinación de dominios bisagra/CH₂: IgA1/IgA1, IgA1/IgA2, IgA1/IgD, IgA1/IgE, IgA1/IgG1, IgA1/IgG2, IgA1/IgG3, IgA1/IgG4, IgA1/IgM, IgA2/IgA1, IgA2/IgA2, IgA2/IgD, IgA2/IgE, IgA2/IgG1, IgA2/IgG2, IgA2/IgG3, IgA2/IgG4, IgA2/IgM, IgD/IgA1, IgD/IgA2, IgD/IgD, IgD/IgE, IgD/IgG1, IgD/IgG2, IgD/IgG3, IgD/IgG4, IgD/IgM, IgG1/IgA1, IgG1/IgA2, IgG1/IgD, IgG1/IgE, IgG1/IgG1, IgG1/IgG2, IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG1/IgM, IgG2/IgA1, IgG2/IgA2, IgG2/IgD, IgG2/IgE, IgG2/IgG1, IgG2/IgG2, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4, IgG2/IgM, IgG3/IgA1, IgG3/IgA2, IgG3/IgD, IgG3/IgE, IgG3/IgG1, IgG3/IgG2, IgG3/IgG3, IgG3/IgG4, IgG3/IgM, IgG4/IgA1, IgG4/IgA2, IgG4/IgD, IgG4/IgE, IgG4/IgG1, IgG4/IgG2, IgG4/IgG3, IgG4/IgG4, IgG4/IgM (o fragmentos o variantes de los mismos), y opcionalmente incluyen un dominio CH₃ de una o más de IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM, y/o un dominio CH₄ de IgE y/o IgM. En realizaciones específicas de la presente descripción, los dominios bisagra, CH₂, CH₃ y CH₄ son de Ig humana.

Ciertos ejemplos incluyen regiones Fc híbridas que comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la

siguiente combinación de dominios bisagra/CH₃: IgA1/IgA1, IgA1/IgA2, IgA1/IgD, IgA1/IgE, IgA1/IgG1, IgA1/IgG2, IgA1/IgG3, IgA1/IgG4, IgA1/IgM, IgA2/IgA1, IgA2/IgA2, IgA2/IgD, IgA2/IgE, IgA2/IgG1, IgA2/IgG2, IgA2/IgG3, IgA2/IgG4, IgA2/IgM, IgD/IgA1, IgD/IgA2, IgD/IgD, IgD/IgE, IgD/IgG1, IgD/IgG2, IgD/IgG3, IgD/IgG4, IgD/IgM, IgG1/IgA1, IgG1/IgA2, IgG1/IgD, IgG1/IgE, IgG1/IgG1, IgG1/IgG2, IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG1/IgM, IgG2/IgA1, IgG2/IgA2, IgG2/IgD, IgG2/IgE, IgG2/IgG1, IgG2/IgG2, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4, IgG2/IgM, IgG3/IgA1, IgG3/IgA2, IgG3/IgD, IgG3/IgE, IgG3/IgG1, IgG3/IgG2, IgG3/IgG3, IgG3/IgG4, IgG3/IgM, IgG4/IgA1, IgG4/IgA2, IgG4/IgD, IgG4/IgE, IgG4/IgG1, IgG4/IgG2, IgG4/IgG3, IgG4/IgG4, IgG4/IgM (o fragmentos o variantes de los mismos), y opcionalmente incluyen un dominio CH₂ domain de una o más de IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM, y/o un dominio CH₄ de IgE y/o IgM. En realizaciones específicas de la presente descripción, los dominios bisagra, CH₂, CH₃ y CH₄ son de Ig humana.

Algunos ejemplos incluyen regiones Fc híbridas que comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en la siguiente combinación de dominios bisagra/CH₄: IgA1/IgE, IgA1/IgM, IgA2/IgE, IgA2/IgM, IgD/IgE, IgD/IgM, IgG1/IgE, IgG1/IgM, IgG2/IgE, IgG2/IgM, IgG3/IgE, IgG3/IgM, IgG4/IgE, IgG4/IgM (o fragmentos o variantes de los mismos), y opcionalmente incluyen un dominio CH₂ de una o más de IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM, y/o un dominio CH₃ de una o más de IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM.

Se pueden encontrar ejemplos específicos de regiones Fc híbridas, por ejemplo, en el documento WO 2008/147143, que se derivan de combinaciones de subclases de IgG o combinaciones de IgD e IgG humanas.

También se incluyen las regiones Fc derivadas o modificadas de otra manera. En ciertos aspectos de la presente descripción, la región Fc puede modificarse por fosforilación, sulfatación, acrilación, glucosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación y similares, por ejemplo, con respecto a una región Fc de tipo silvestre o de origen natural. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la región Fc puede comprender patrones de glucosilación de tipo silvestre o nativos, o como alternativa, puede comprender glucosilación aumentada con respecto a una forma nativa, glucosilación disminuida con respecto a una forma nativa, o puede estar completamente desglucosilada. Como ejemplo de una glucoforma de Fc modificada, la glucosilación disminuida de una región Fc reduce la unión a la región C1q del primer componente C1 del complemento, una disminución en la actividad relacionada con ADCC y/o una disminución en la actividad relacionada con CDC. Ciertas realizaciones de la presente descripción emplean, por tanto, una región Fc desglucosilada o aglucosilada. Véase, por ejemplo, el documento WO 2005/047337 para la producción de regiones Fc aglucosiladas ejemplares. Otro ejemplo de una glucoforma de la región Fc puede generarse sustituyendo la posición Q295 con un residuo de cisteína (véase, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos N.º 2010/0080794), de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat y col. Ciertas realizaciones de la presente descripción pueden incluir regiones Fc donde aproximadamente el 80-100 % de la glucoproteína en la región Fc comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fructosa (véase, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos N.º 2010/0255013). Algunas realizaciones de la presente descripción pueden incluir regiones Fc que están optimizadas por sustitución o eliminación para reducir el nivel de fucosilación, por ejemplo, para aumentar la afinidad por FcγRI, FcγRIa o FcγRIIIa, y/o para mejorar la fagocitosis por células que expresan FcγRIIIa (véanse las solicitudes de Estados Unidos N.º 2010/0249382 y 2007/0148170).

Como otro ejemplo de una glucoforma de Fc modificada, una región Fc puede comprender N-glucanos de tipo oligomanosa y, opcionalmente, tener una o más de las siguientes: mayor actividad de ADCC, mayor afinidad de unión por FcγRIIIA (y algunos otros FcR), similar o mayor especificidad de unión para la diana del polipéptido de HRS, similar o mayor afinidad de unión por la diana del polipéptido de HRS, y/o similar o menor afinidad de unión por el receptor de manosa, con respecto a la región Fc correspondiente o el conjugado HRS-Fc que contiene complejos tipo N-glucanos (véase, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos N.º 2007/0092521 y la patente de Estados Unidos N.º 7.700.321). Como otro ejemplo, la afinidad mejorada de las regiones Fc por FcγR se ha conseguido usando glucoformas creadas por ingeniería genética generadas por la expresión de anticuerpos en líneas celulares variantes o modificadas por ingeniería genética (véase, por ejemplo, Umana y col., Nat Biotechnol. 17: 176-180, 1999; Davies y col., Biotechnol Bioeng. 74: 288-294, 2001; Shields y col., J. Biol Chem. 277: 26733-26740, 2002; Shinkawa y col., 2003, J Biol Chem. 278: 3466-3473, 2003 y la solicitud de Estados Unidos N.º 2007/0111281). Ciertas glucoformas de la región Fc comprenden una proporción aumentada de cadenas de azúcares complejas de tipo N-glucósido, que no tienen la posición 1 de fucosa unida a la posición 6 de N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar (véase, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos N.º 2010/0092997). Las realizaciones particulares de la presente descripción pueden incluir la región Fc de IgG que está glucosilada con al menos un resto galactosa conectado a un resto de ácido siálico terminal respectivo mediante un enlace α-2,6, opcionalmente cuando la región Fc tiene una mayor actividad antiinflamatoria con respecto a una región Fc de tipo silvestre correspondiente (véase la solicitud de Estados Unidos N.º 2008/0206246). Ciertos de estos enfoques de glucosilación alterada y otros relacionados han generado mejoras sustanciales de la capacidad de las regiones Fc

para unirse selectivamente a FcR tales como Fc γ RIII, para mediar la ADCC y para alterar otras propiedades de las regiones Fc, como se describe en el presente documento.

Ciertas regiones Fc variantes, fragmentos, híbridas o modificadas de otra manera pueden tener unión alterada a uno o más FcR, con respecto a una secuencia Fc de tipo silvestre correspondiente (por ejemplo, la misma especie, la misma clase de Ig, la misma subclase de Ig). Por ejemplo, dichas regiones Fc pueden tener una unión aumentada a uno o más de los receptores de Fc γ , receptores de Fc α , receptores de Fc ϵ y/o el receptor de Fc neonatal, con respecto a una secuencia Fc de tipo silvestre correspondiente. En otras realizaciones de la presente descripción, regiones Fc variantes, fragmentos, híbridas o modificadas pueden tener una unión disminuida a uno o más de los receptores de Fc γ , receptores de Fc α , receptores de Fc ϵ y/o el receptor de Fc neonatal, con respecto a una secuencia de Fc de tipo silvestre correspondiente. Los FcR específicos se describen en otra parte en el presente documento.

Los ejemplos específicos de variantes de Fc que tienen unión a FcR alterada (por ejemplo, aumentada, disminuida) se pueden encontrar, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 5.624.821 y 7.425.619; las solicitudes de Estados Unidos N.º 2009/0017023, 2009/0010921 y 2010/0203046; y los documentos WO 2000/42072 y WO 2004/016750. Ciertos ejemplos incluyen regiones Fc humanas que tienen una o más sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334, por ejemplo, S298A, E333A y/o K334A (basándose en la numeración del índice UE de Kabat y col.), que se ha demostrado que aumenta la unión al receptor activador Fc γ RIIIa y reduce la unión al receptor inhibidor Fc γ RIIb. Estas mutaciones se pueden combinar para obtener variantes de mutación dobles y triples que tienen mejoras adicionales en la unión a FcR. Ciertas realizaciones de la presente descripción incluyen un mutante triple S298A/E333A/K334A, que tiene unión aumentada a Fc γ RIIIa, unión disminuida a Fc γ RIIb y ADCC aumentada (véase, por ejemplo, Shields y col., J Biol Chem. 276: 6591-6604, 2001, y Presta y col., Biochem Soc Trans. 30: 487-490, 2002). Véase también las glucoformas de Fc diseñadas por manipulación genética que tienen una mayor unión a los FcR, como se describe en Umana y col., mencionado anteriormente; y la patente de Estados Unidos N.º 7.662.925. Algunas realizaciones de la presente descripción incluyen regiones Fc que comprenden una o más sustituciones seleccionadas de 434S, 252Y/428L, 252Y/434S y 428L/434S (véase las solicitudes de Estados Unidos N.º 2009/0163699 y 20060173170), basadas en el índice UE de Kabat y col.

Ciertas regiones Fc variantes, fragmentos, híbridas o modificadas pueden tener funciones efectoras alteradas, con respecto a una secuencia de Fc de tipo silvestre correspondiente. Por ejemplo, dichas regiones Fc pueden tener una mayor fijación o activación del complemento, mayor afinidad de unión a C1q, mayor actividad relacionada con CDC, mayor actividad relacionada con ADCC y/o mayor actividad relacionada con ADCP, con respecto a una secuencia Fc de tipo silvestre correspondiente. En otras realizaciones de la presente descripción, dichas regiones Fc pueden tener una fijación o activación del complemento disminuida, una afinidad de unión a C1q disminuida, una actividad relacionada con CDC disminuida, una actividad relacionada con ADCC disminuida y/o una actividad relacionada con ADCP disminuida, con respecto a una secuencia de Fc de tipo silvestre correspondiente. Como meramente un ejemplo ilustrativo, una región Fc puede comprender una eliminación o sustitución en un sitio de unión al complemento, tal como un sitio de unión a C1q, y/o una eliminación o sustitución en un sitio de ADCC. Ejemplos de dichas eliminaciones/sustituciones se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 7.030.226. Muchas funciones efectoras de Fc, tales como ADCC, pueden ensayarse de acuerdo con técnicas de rutina en la técnica (véase, por ejemplo, Zuckerman y col., CRC Crit Rev Microbiol. 7: 1-26, 1978). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen, aunque sin limitarse a, linfocitos citotóxicos naturales (NK), macrófagos y otras células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Como alternativa, o adicionalmente, ciertas funciones efectoras de Fc pueden evaluarse *in vivo*, por ejemplo, empleando un modelo animal descrito en Clynes y col. PNAS. 95: 652-656, 1998.

Ciertas regiones Fc variantes, híbridas o modificadas pueden tener estabilidad o semivida relativas a una secuencia Fc de tipo silvestre correspondiente. En ciertas realizaciones de la presente descripción, dichas regiones Fc pueden tener una semivida aumentada con respecto a una secuencia Fc de tipo silvestre correspondiente. En otras realizaciones de la presente descripción, las regiones Fc híbridas variantes o modificadas pueden tener una semivida reducida con respecto a una secuencia Fc de tipo silvestre correspondiente. La semivida se puede medir *in vitro* (por ejemplo, en condiciones fisiológicas) o *in vivo*, de acuerdo con técnicas de rutina en la técnica, tales como radioetiquetado, ELISA u otros procedimientos. Las mediciones *in vivo* de estabilidad o semivida se pueden medir en uno o más fluidos corporales, incluyendo sangre, suero, plasma, orina o líquido cefalorraquídeo, o un tejido dado, tal como hígado, riñones, músculos, tejidos del sistema nervioso central, hueso, etc. Como ejemplo, las modificaciones a una región Fc que alteran su capacidad para unirse al FcRn pueden alterar su semivida *in vivo*. Los ensayos para medir las propiedades farmacocinéticas *in vivo* (por ejemplo, la semivida de eliminación media *in vivo*) y los ejemplos no limitantes de modificaciones de Fc que alteran su unión al FcRn se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 7.217.797 y 7.732.570; y las solicitudes de Estados Unidos N.º US 2010/0143254 y

2010/0143254.

- Ejemplos no limitantes adicionales de modificaciones para alterar la estabilidad o la semivida incluyen sustituciones/eliminaciones en uno o más de los residuos de aminoácidos seleccionados de entre 251-256, 285-290 y 308-314 en el dominio CH₂, y 385-389 y 428-436 en el dominio CH₃, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat y col. Véase la solicitud de Estados Unidos N.º 2003/0190311. Los ejemplos específicos incluyen la sustitución con leucina en la posición 251, la sustitución con tirosina, triptófano o fenilalanina en la posición 252, la sustitución con treonina o serina en la posición 254, la sustitución con arginina en la posición 255, la sustitución con glutamina, arginina, serina, treonina o glutamato en la posición 256, sustitución con treonina en la posición 308, la sustitución con prolina en la posición 309, la sustitución con serina en la posición 311, la sustitución con aspartato en la posición 312, la sustitución con leucina en la posición 314, la sustitución con arginina, aspartato o serina en la posición 385, la sustitución con treonina o prolina en la posición 386, la sustitución con arginina o prolina en la posición 387, la sustitución con prolina, asparagina o serina en la posición 389, la sustitución con metionina o treonina en la posición 428, la sustitución con tirosina o fenilalanina en la posición 434, la sustitución con histidina, arginina, lisina o serina en la posición 433 y/o la sustitución con histidina, tirosina, arginina o treonina en la posición 436, incluyendo cualquier combinación de las mismas. Dichas modificaciones aumentan opcionalmente la afinidad de la región Fc por el FcRn y, por lo tanto, aumentan la semivida, con respecto a una región Fc de tipo silvestre correspondiente.
- 20 Ciertas regiones Fc variantes, híbridas o modificadas, pueden tener una solubilidad alterada con respecto a una secuencia Fc de tipo silvestre correspondiente. En ciertas realizaciones de la presente descripción, dichas regiones Fc pueden tener mayor solubilidad con respecto a una secuencia Fc de tipo silvestre correspondiente. En otras realizaciones de la presente descripción, las regiones Fc variantes, híbridas o modificadas pueden tener una solubilidad disminuida con respecto a una secuencia Fc de tipo silvestre correspondiente. La solubilidad se puede medir, por ejemplo, *in vitro* (por ejemplo, en condiciones fisiológicas) de acuerdo con técnicas de rutina en la técnica. Las mediciones de solubilidad ejemplares se describen en otra parte en el presente documento.

- Los ejemplos adicionales de variantes incluyen regiones Fc de IgG que tienen sustituciones conservativas o no conservativas (como se describe en otra parte en el presente documento) en una o más de las posiciones 250, 314 o 428 de la cadena pesada, o en cualquier combinación de las mismas, tal como en las posiciones 250 y 428, o en las posiciones 250 y 314, o en las posiciones 314 y 428, o en las posiciones 250, 314 y 428 (véase, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos N.º 2011/0183412). En realizaciones específicas de la presente descripción, el residuo en la posición 250 está sustituido con ácido glutámico o glutamina, y/o el residuo en la posición 428 está sustituido con leucina o fenilalanina. Como otro ejemplo ilustrativo de una variante de Fc de IgG, uno cualquiera o más de los residuos de aminoácidos en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322 y/o 327 a 331 se pueden usar como una diana adecuada para la modificación (por ejemplo, sustitución conservativa o no conservativa, eliminación). En realizaciones particulares de la presente descripción, el dominio CH₂ variante de Fc de IgG contiene sustituciones de aminoácidos en las posiciones 228, 234, 235 y/o 331 (por ejemplo, IgG4 humana con mutaciones Ser228Pro y Leu235Ala) para atenuar las funciones efectoras de la región Fc (véase la patente de Estados Unidos N.º 7.030.226). En este contexto, la numeración de los residuos en la cadena pesada es la del índice UE (véase Kabat y col., «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5ª edición, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Algunas de estas y realizaciones relacionadas de la presente descripción tienen alterada (por ejemplo, aumentada, disminuida) la unión a FcRn y/o la semivida en suero, opcionalmente sin funciones efectoras reducidas tales como actividades relacionadas con ADCC o CDC.

- Los ejemplos adicionales incluyen regiones Fc variantes que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 279, 341, 343 o 373 de una región Fc de tipo silvestre, o cualquier combinación de las mismas (véase, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos N.º 2007/0224188). Los residuos de aminoácidos de tipo silvestre en estas posiciones para la IgG humana son valina (279), glicina (341), prolina (343) y tirosina (373). La o las sustituciones pueden ser conservativas o no conservativas, o pueden incluir aminoácidos o miméticos de origen no natural, como se describe en el presente documento. Solas o en combinación con estas sustituciones, ciertas realizaciones de la presente descripción también pueden emplear una región Fc variante que comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de entre las siguientes: 235G, 235R, 236F, 236R, 236Y, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 244L, 245R, 247A, 247D, 247E, 247F, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247T, 247W, 247Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256H, 256I, 256K, 256L, 256V, 256W, 256Y, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S, 262L, 264S, 265K, 265S, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 271T, 272H, 272K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279F, 279G, 279H, 279I, 279K, 279L, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283P, 283R, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I,

292L, 293S, 293V, 301W, 304E, 307E, 307M, 312P, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316F, 316K, 317P, 317T, 318N, 318P, 318T, 332F, 332G, 332L, 332M, 332S, 332V, 332W, 339D, 339E, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339L, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343I, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373G, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376E, 376F, 376G, 376H, 376I, 376L, 376M, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 376W, 376Y, 377G, 377K, 377P, 378N, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380D, 380N, 380S, 380T, 382D, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382P, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 385E, 385P, 386K, 423N, 424H, 424M, 424V, 426D, 426L, 427N, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430J, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431I, 431K, 431P, 432R, 432S, 438G, 438K, 438L, 438T, 438W, 439E, 439H, 439Q, 440D, 440E, 440F, 440G, 440H, 440I, 440K, 440L, 440M, 440Q, 440T, 440V o 442K. Como anteriormente, la numeración de los residuos en la cadena pesada es la del índice UE (véase Kabat y col., mencionado anteriormente). Dichas regiones Fc variantes confieren típicamente una función efectora alterada o una semivida en suero alterada al polipéptido de HRS al que está unida operativamente la región Fc variante. Preferentemente, la función efectora alterada es un aumento en ADCC, una disminución en ADCC, un aumento en CDC, una disminución en CDC, un aumento en la afinidad de unión a Clq, una disminución en la afinidad de unión a Clq, un aumento en la afinidad de unión a FcR (preferentemente FcRn) o una disminución en la afinidad de unión a FcR (preferentemente FcRn) en comparación con una región Fc correspondiente que carece de dicha o dichas sustituciones de aminoácidos.

Los ejemplos adicionales incluyen regiones Fc variantes que comprenden una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones 221, 222, 224, 227, 228, 230, 231, 223, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 250, 258, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 283, 285, 286, 288, 290, 291, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 302, 313, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335 336 y/o 428 (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 7.662.925). En realizaciones específicas de la presente descripción, la región Fc variante comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: P230A, E233D, L234E, L234Y, L234I, L235D, L235S, L235Y, L235I, S239D, S239E, S239N, S239Q, S239T, V240I, V240M, F243L, V264I, V264T, V264Y, V266I, E272Y, K274T, K274E, K274R, K274L, K274Y, F275W, N276L, Y278T, V302I, E318R, S324D, S324I, S324V, N325T, K326I, K326T, L328M, L328I, L328Q, L328D, L328V, L328T, A330Y, A330L, A330I, I332D, I332E, I332N, I332Q, T335D, T335R y T335Y. En otras realizaciones específicas de la presente descripción, la región Fc variante comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: V264I, F243L/V264I, L328M, I332E, L328M/I332E, V264I/I332E, S298A/I332E, S239E/I332E, S239Q/I332E, S239E, A330Y, I332D, L328I/I332E, L328Q/I332E, V264T, V240I, V266I, S239D, S239D/I332D, S239D/I332E, S239D/I332N, S239D/I332Q, S239E/I332D, S239E/I332N, S239E/I332Q, S239N/I332D, S239N/I332E, S239Q/I332D, A330Y/I332E, V264I/A330Y/I332E, A330L/I332E, V264I/A330L/I332E, L234E, L234Y, L234I, L235D, L235S, L235Y, L235I, S239T, V240M, V264Y, A330I, N325T, L328D/I332E, L328V/I332E, L328T/I332E, L328I/I332E, S239E/V264I/I332E, S239Q/V264I/I332E, S239E/V264I/A330Y/I332E, S239D/A330Y/I332E, S239N/A330Y/I332E, S239D/A330L/I332E, S239N/A330L/I332E, V264I/S298A/I332E, S239D/S298A/I332E, S239D/S298A/I330I, S239D/V264I/I332E, S239D/V264I/S298A/I332E, S239D/V264I/A330L/I332E, S239D/I332E/A330I, P230A, P230A/E233D/I332E, E272Y, K274T, K274E, K274R, K274L, K274Y, F275W, N276L, Y278T, V302I, E318R, S324D, S324I, S324V, K326I, K326T, T335D, T335R, T335Y, V240I/V266I, S239D/A330Y/I332E/L234I, S239D/A330Y/I332E/L235D, S239D/A330Y/I332E/V240I, S239D/A330Y/I332E/V264T, S239D/A330Y/I332E/K326E y S239D/A330Y/I332E/K326T. En realizaciones más específicas de la presente descripción, la región Fc variante comprende una serie de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: N297D/I332E, F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E, S239D/N297D/I332E, S239E/N297D/I332E, S239D/D265Y/N297D/I332E, S239D/D265H/N297D/I332E, V264E/N297D/I332E, Y296N/N297D/I332E, N297D/A330Y/I332E, S239D/D265V/N297D/I332E, S239D/D265I/N297D/I332E y N297D/S298A/A330Y/I332E. En realizaciones específicas de la presente descripción, la región Fc variante comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 332 (usando la numeración del índice UE, Kabat y col., mencionado anteriormente). Los ejemplos de sustituciones incluyen 332A, 332D, 332E, 332F, 332G, 332H, 332K, 332L, 332M, 332N, 332P, 332Q, 332R, 332S, 332T, 332V, 332W y 332Y. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice UE de Kabat y col. Entre otras propiedades descritas en el presente documento, dichas regiones Fc variantes pueden tener afinidad aumentada por un FcγR, estabilidad aumentada y/o solubilidad aumentada, con respecto a una región Fc de tipo silvestre correspondiente.

Otros ejemplos incluyen regiones Fc variantes que comprenden una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 224N/Y, 225A, 228L, 230S, 239P, 240A, 241L, 243S/L/G/H/I, 244L, 246E, 247L/A, 252T, 254T/P, 258K, 261Y, 265V, 266A, 267G/N, 268N, 269K/G, 273A, 276D, 278H, 279M, 280N, 283G, 285R, 288R, 289A, 290E, 291L, 292Q, 297D, 299A, 300H, 301C, 304G, 305A, 306I/F, 311R, 312N, 315D/K/S, 320R, 322E, 323A, 324T, 325S,

326E/R, 332T, 333D/G, 335I, 338R, 339T, 340Q, 341E, 342R, 344Q, 347R, 351S, 352A, 354A, 355W, 356G, 358T, 361D/Y, 362L, 364C, 365Q/P, 370R, 372L, 377V, 378T, 383N, 389S, 390D, 391C, 393A, 394A, 399G, 404S, 408G, 409R, 411I, 412A, 414M, 421S, 422I, 426F/P, 428T, 430K, 431S, 432P, 433P, 438L, 439E/R, 440G, 441F, 442T, 445R, 446A, 447E, opcionalmente, cuando la variante tiene reconocimiento alterado de un ligando de Fc y/o una función efectora alterada en comparación con un polipéptido Fc parental, y donde la numeración de los residuos es la del índice UE como en Kabat y col. Los ejemplos específicos de estas y realizaciones relacionadas de la presente descripción incluyen regiones Fc variantes que comprenden o consisten en los siguientes conjuntos de sustituciones: (1) N276D, R292Q, V305A, I377V, T394A, V412A y K439E; (2) P244L, K246E, D399G y K409R; (3) S304G, K320R, S324T, K326E y M358T; (4) F243S, P247L, D265V, V266A, S383N y T411I; (5) H224N, F243L, T393A y H433P; (6) V240A, S267G, G341E y E356G; (7) M252T, P291L, P352A, R355W, N390D, S408G, S426F y A431S; (8) P228L, T289A, L365Q, N389S y S440G; (9) F241L, V273A, K340Q y L441F; (10) F241L, T299A, I332T y M428T; (11) E269K, Y300H, Q342R, V422I y G446A; (12) T225A, R301c, S304G, D312N, N315D, L351S y N421S; (13) S254T, L306I, K326R y Q362L; (14) H224Y, P230S, V323A, E333D, K338R y S364C; (15) T335I, K414M y P445R; (16) T335I y K414M; (17) P247A, E258K, D280N, K288R, N297D, T299A, K322E, Q342R, S354A y L365P; (18) H268N, V279M, A339T, N361D y S426P; (19) C261Y, K290E, L306F, Q311R, E333G y Q438L; (20) E283G, N315K, E333G, R344Q, L365P y S442T; (21) Q347R, N361Y y K439R; (22) S239P, S254P, S267N, H285R, N315S, F372L, A378T, N390D, Y391C, F404S, E430K, L432P y K447E; y (23) E269G, Y278H, N325S y K370R, donde la numeración de los residuos es la del índice UE como en Kabat y col., (véase, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos N.º 2010/0184959).

Otro ejemplo específico de una variante de Fc comprende la secuencia de la SEQ ID NO:155, donde Xaa en la posición 1 es Ala o está ausente; Xaa en la posición 16 es Pro o Glu; Xaa en la posición 17 es Phe, Val o Ala; Xaa en la posición 18 es Leu, Glu o Ala; Xaa en la posición 80 es Asn o Ala; y/o Xaa en la posición 230 es Lys o está ausente (véase, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos N.º 2007/0253966). Ciertas de estas regiones Fc, y los conjugados HRS-Fc relacionados, tienen semivida aumentada, actividad efectora reducida y/o son significativamente menos inmunógenas que las secuencias Fc de tipo silvestre.

Las regiones Fc variantes también pueden tener una o más regiones bisagra mutadas, como se describe, por ejemplo, en la solicitud de Estados Unidos N.º 2003/0118592. Por ejemplo, una o más cisteínas en una región bisagra se pueden eliminar o sustituir con un aminoácido diferente. La región bisagra mutada puede no comprender residuos de cisteína, o puede comprender 1, 2 o 3 residuos de cisteína menos que una región bisagra de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones de la presente descripción, una región Fc que tiene una región bisagra mutada de este tipo exhibe una capacidad reducida para dimerizar, con respecto a una región bisagra de Ig de tipo silvestre.

Como se ha señalado anteriormente, los conjugados HRS-Fc, tales como las proteínas de fusión HRS-Fc, típicamente tienen propiedades farmacocinéticas alteradas (por ejemplo, mejoradas, aumentadas, disminuidas) con respecto a los polipéptidos de HRS correspondientes. Los ejemplos de propiedades farmacocinéticas incluyen estabilidad o semivida, biodisponibilidad (la fracción de un fármaco que se absorbe), distribución tisular, volumen de distribución (volumen aparente donde un fármaco se distribuye inmediatamente después de haber sido inyectado por vía intravenosa y se equilibra entre plasma y los tejidos circundantes), concentración (concentración inicial o en equilibrio del fármaco en plasma), constante de la tasa de eliminación (tasa a la que se eliminan los fármacos del cuerpo), tasa de eliminación (tasa de infusión requerida para equilibrar la eliminación), área bajo la curva (AUC o exposición; integral de la curva de concentración-tiempo, después de una dosis única o en situación de equilibrio), aclaramiento (volumen de plasma aclarado del fármaco por unidad de tiempo), C_{max} (concentración plasmática máxima de un fármaco después de la administración oral), t_{max} (tiempo hasta alcanzar la C_{max}), C_{min} (la concentración más baja que alcanza un fármaco antes de que se administre la siguiente dosis) y la fluctuación (fluctuación entre máximos dentro un intervalo de dosificación en situación de equilibrio). En algunos aspectos de la presente descripción, estas propiedades mejoradas se consiguen sin alterar significativamente la estructura secundaria y/o reducir la actividad biológica no canónica del polipéptido de HRS. De hecho, algunos conjugados HRS-Fc tienen un aumento de la actividad biológica no canónica.

Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente descripción, el conjugado HRS-Fc o el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene un perfil de AUC farmacocinético en plasma o suero al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 50, 100, 200, 300, 400 o 500 veces mayor que un polipéptido de HRS no modificado o modificado de manera diferente correspondiente, cuando se administra a un mamífero en condiciones iguales o comparables. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el conjugado HRS-Fc o el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene una estabilidad (por ejemplo, medida mediante semivida) que es al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 % mayor que un polipéptido de HRS no modificado o modificado de manera diferente correspondiente, cuando se compara en condiciones similares a

temperatura ambiente, por ejemplo, en PBS a pH 7,4 durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 días, o 1, 2, 3, 4 semanas más o menos.

- En realizaciones particulares de la presente descripción, un conjugado HRS-Fc o un polipéptido de fusión HRS-Fc
- 5 tiene una semivida biológica a pH 7,4, 25 °C, por ejemplo, un pH fisiológico, temperatura corporal humana (por ejemplo, *in vivo*, en suero, en un tejido dado, en una especie dada tal como rata, ratón, mono o ser humano), de aproximadamente o al menos aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas,
- 10 aproximadamente 30 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 50 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 70 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 80 horas, aproximadamente 84 horas, aproximadamente 90 horas, aproximadamente 96 horas, aproximadamente 120 horas, o aproximadamente 144 horas o más o cualquier semivida intermedia.
- 15 En ciertas realizaciones de la presente descripción, el conjugado HRS-Fc o el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene una mayor biodisponibilidad después de la administración subcutánea (SC) en comparación con un polipéptido de HRS no modificado correspondiente. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el conjugado HRS-Fc o el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 100 %, o más biodisponibilidad en comparación con el polipéptido de HRS no modificado correspondiente.
- 20

- En ciertas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene sustancialmente la misma
- 25 estructura secundaria que un polipéptido de HRS no modificado o modificado de manera diferente correspondiente, de acuerdo con se determina mediante un análisis de dicroísmo circular UV. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene sustancialmente la misma actividad que un polipéptido de HRS no modificado o modificado de manera diferente correspondiente, en un ensayo de actividad antiinflamatoria. En otras realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,
- 30 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces la actividad de un polipéptido de HRS no modificado o modificado de manera diferente correspondiente, en un ensayo de actividad antiinflamatoria.

Enlazadores peptídicos

- 35 En ciertas realizaciones de la presente descripción, se puede emplear una secuencia de enlazador peptídico para separar el o los polipéptidos de HRS y la o las regiones Fc en una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliegue a sus estructuras secundarias y terciarias deseadas. Dicha secuencia de enlazador peptídico puede incorporarse a la proteína de fusión usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica.
- 40 Ciertas secuencias de enlazador peptídico se pueden seleccionar basándose en los siguientes factores ejemplares: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que podría interactuar con los epítomos funcionales en el primer y segundo polipéptidos; (3) su estabilidad fisiológica; y (4) la falta de residuos hidrófobos o cargados que puedan reaccionar con los epítomos funcionales del polipéptido, u otras características. Véase, por ejemplo, George y Heringa, J Protein Eng. 15: 871-879, 2002.
- 45

- La secuencia de enlazador generalmente puede tener una longitud de 1 a aproximadamente 200 aminoácidos. Los enlazadores particulares pueden tener una longitud global de aminoácidos de aproximadamente 1-200 aminoácidos, 1-150 aminoácidos, 1-100 aminoácidos, 1-90 aminoácidos, 1-80 aminoácidos, 1-70 aminoácidos, 1-60 aminoácidos,
- 50 1-50 aminoácidos, 1-40 aminoácidos, 1-30 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-5 aminoácidos, 1-4 aminoácidos, 1-3 aminoácidos, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos.

- 55 Un enlazador peptídico puede emplear uno cualquiera o más aminoácidos de origen natural, aminoácidos de origen no natural, análogos de aminoácidos y/o miméticos de aminoácidos como se describe en otra parte en el presente documento y se conoce en la técnica. Ciertas secuencias de aminoácidos que pueden emplearse de manera útil como enlazadores incluyen las divulgadas en Maratea y col., *Gene* 40: 39-46, 1985; Murphy y col., *PNAS EE. UU.* 83: 8258-8262, 1986; patente de Estados Unidos N.º 4.935.233 y patente de Estados Unidos N.º 4.751.180. Las
- 60 secuencias de enlazador peptídico particulares contienen residuos Gly, Ser y/o Asn. Si se desea, también se pueden

emplear otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala, en la secuencia de enlazador peptídico.

Ciertos enlazadores ejemplares incluyen enlazadores que contienen Gly, Ser y/o Asn, de la siguiente manera: enlazadores [G]_x, [S]_x, [N]_x, [GS]_x, [GGS]_x, [GSS]_x, [GSGS]_x (SEQ ID NO:200), [GGSG]_x (SEQ ID NO:201), [GGGS]_x (SEQ ID NO:202), [GGGGS]_x (SEQ ID NO:203), [GN]_x, [GGN]_x, [GNN]_x, [GNGN]_x (SEQ ID NO:204), [GGNG]_x (SEQ ID NO:205), [GGGN]_x (SEQ ID NO:206), [GGGGN]_x (SEQ ID NO:207), donde x es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 o más. Otras combinaciones de estos y aminoácidos relacionados serán evidentes para los expertos en la materia.

- 10 Los ejemplos adicionales de péptidos enlazadores incluyen, aunque sin limitarse a las siguientes secuencias de aminoácidos: Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-(SEQ ID NO:208); Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-(SEQ ID NO:209); Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-(SEQ ID NO:210); Asp-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Asp-Ala-Ala-Ala-Arg-Glu-Ala-Ala-Ala-Arg-Asp-Ala-Ala-Ala-Lys-(SEQ ID NO:211); y Asn-Val-Asp-His-Lys-Pro-Ser-Asn-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Arg-(SEQ ID NO:212).

- Otros ejemplos no limitantes de péptidos enlazadores incluyen DGGGS (SEQ ID NO:213); TGEKP (SEQ ID NO:214) (véase, por ejemplo, Liu y col., *PNAS*. 94: 5525-5530, 1997); GGRR (SEQ ID NO:215) (Pomerantz y col. 1995); (GGGGS)_n (SEQ ID NO:203) (Kim y col., *PNAS*. 93: 1156-1160, 1996); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO:216) (Chaudhary y col., *PNAS*. 87: 1066-1070, 1990); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO:217) (Bird y col., *Science*. 242: 423-426, 1988), GGRRGGGS (SEQ ID NO:218); LRQRDGERP (SEQ ID NO:219); LRQKDDGGSERP (SEQ ID NO:220); LRQKd(GGGS)₂ ERP (SEQ ID NO:221). En realizaciones específicas de la presente descripción, la secuencia de enlazador comprende una secuencia de enlazador Gly₃, que incluye tres residuos de glicina. En realizaciones particulares de la presente descripción, los enlazadores flexibles pueden diseñarse racionalmente usando un programa informático capaz de modelizar tanto los sitios de unión a ADN como los propios péptidos (Desjarlais y Berg, *PNAS*. 90: 2256-2260, 1993; y *PNAS*. 91: 11099-11103, 1994) o mediante procedimientos de presentación en fagos.

- Los enlazadores peptídicos pueden ser fisiológicamente estables o pueden incluir un enlazador liberable tal como un enlazador fisiológicamente degradable o enzimáticamente escindible (por ejemplo, un enlazador escindible proteolíticamente). En ciertas realizaciones de la presente descripción, uno o más enlazadores liberables pueden dar como resultado una semivida más corta y un aclaramiento más rápido del conjugado. Estas y otras realizaciones relacionadas de la presente descripción se pueden usar, por ejemplo, para mejorar la solubilidad y la vida útil en la circulación sanguínea de los polipéptidos de HRS en el torrente sanguíneo, mientras que también se suministra un polipéptido de HRS al torrente sanguíneo que, posteriormente a la degradación del enlazador, está sustancialmente libre de la o las regiones Fc. Estos aspectos de la presente descripción son especialmente útiles en aquellos casos donde los polipéptidos de HRS, cuando se conjugan permanentemente a una región Fc, demuestran una actividad reducida. Usando los enlazadores que se proporcionan en el presente documento, dichos polipéptidos de HRS pueden mantener su actividad terapéutica cuando están en forma conjugada. Como otro ejemplo, se puede administrar un polipéptido conjugado HRS-Fc grande y relativamente inerte, que a continuación se degrada *in vivo* (mediante el enlazador degradable) para generar un polipéptido de HRS bioactivo que posee una parte de la región Fc o que carece por completo de la región Fc. De esta y otras maneras, las propiedades del polipéptido conjugado HRS-Fc se pueden adaptar de manera más eficaz para equilibrar la bioactividad y la semivida en circulación del polipéptido de HRS a lo largo del tiempo.

- En realizaciones particulares de la presente descripción, el péptido enlazador comprende un sitio de escisión del péptido autocatalítico o de autoescisión. En una realización particular de la presente descripción, los péptidos de autoescisión incluyen aquellas secuencias polipeptídicas obtenidas de péptidos de potyvirus y cardiovirus 2A, FMDV (virus de la fiebre aftosa), virus A de rinitis equina, virus de Thosa asigna y tescovirus porcino. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el sitio del polipéptido de autoescisión comprende un sitio, secuencia o dominio 2A o similar a 2A (Donnelly y col., *J. Gen. Virol.* 82: 1027-1041, 2001). Los sitios 2A ejemplares incluyen las siguientes secuencias: LLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:222); TLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:223); LLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:224); NFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:225); QLLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:226); APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:227); VTELLYRMKRAETYCPRLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT (SEQ ID NO:228); LNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:229); LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:230); y EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:231). En una realización de la presente descripción, el sitio de escisión del péptido autocatalítico comprende una secuencia señal de traducción 2A, tal como, por ejemplo, la región 2A de la poliproteína del virus de la fiebre aftosa (FMDV), que es una secuencia de 18 aminoácidos. Los ejemplos adicionales de secuencias similares a 2A que pueden usarse incluyen poliproteínas de virus de insectos, la

proteína NS34 de los rotavirus de tipo C y secuencias repetidas en *Trypanosoma spp.*, Como se describe, por ejemplo, en Donnelly y col., *Journal of General Virology*. 82: 1027-1041, 2001.

Los sitios de escisión de proteasas y los péptidos de autoescisión adecuados son conocidos por los expertos (véase, por ejemplo, Ryan y col., *J. Gener. Virol.* 78: 699-722, 1997; y Scymczak y col., *Nature Biotech.* 5: 589-594, 2004). Los sitios ejemplares de escisión de proteasas incluyen, aunque sin limitarse a, los sitios de escisión de proteasas NIa de potyvirus (por ejemplo, proteasas del virus del jaspeado del tabaco), las proteasas HC de potyvirus, las proteasas P1 (P35) de potyvirus, las proteasas NIa de biovirus, las proteasas codificadas por ARN-2 de biovirus, proteasas L de aftovirus, proteasas 2A de enterovirus, proteasas 2A de rinovirus, proteasas 3C de picornavirus, proteasas 24K de comovirus, proteasas 24K de nepovirus, proteasa similar a 3C de RTSV (virus esférico del tungro del arroz), proteasa similar a 3C de PYVF (virus del moteado amarillo de la chirimía), heparina, trombina, factor Xa y enterocinasa. Debido a su alta rigurosidad de escisión, los sitios de escisión de la proteasa de TEV (virus de jaspeado del tabaco) se incluyen en algunas realizaciones de la presente descripción, por ejemplo, EXXYXQ (G/S) (SEQ ID NO:232), por ejemplo, ENLYFQG (SEQ ID NO:233) y ENLYFQS (SEQ ID NO:234), donde X representa cualquier aminoácido (la escisión por TEV se produce entre Q y G o Q y S).

Otros ejemplos de enlazadores degradables enzimáticamente adecuados para uso en realizaciones particulares de la presente descripción incluyen, aunque sin limitarse a: una secuencia de aminoácidos escindida por una serina proteasa tal como trombina, quimotripsina, tripsina, elastasa, calicreína o subtilisina. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de aminoácidos escindibles por trombina incluyen, aunque sin limitarse a: -Gly-Arg-Gly-Asp- (SEQ ID NO:235), -Gly-Gly-Arg-, -Gly-Arg-Gly-Asp-Asn-Pro- (SEQ ID NO:236), -Gly-Arg-Gly-Asp-Ser- (SEQ ID NO:237), -Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys- (SEQ ID NO:238), -Gly-Pro-Arg-, -Val-Pro-Arg-, y -Phe-Val-Arg-. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de aminoácidos escindibles por elastasa incluyen, aunque sin limitarse a: -Ala-Ala-Ala-, -Ala-Ala-Pro-Val- (SEQ ID NO:239), -Ala-Ala-Pro-Leu- (SEQ ID NO:240), -Ala-Ala-Pro-Phe- (SEQ ID NO:241), -Ala-Ala-Pro-Ala- (SEQ ID NO:242) y -Ala-Tyr-Leu-Val- (SEQ ID NO:243).

Los enlazadores enzimáticamente degradables también incluyen secuencias de aminoácidos que pueden ser escindidas por una metaloproteinasa de la matriz tal como collagenasa, estromelina y gelatinasa. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de aminoácidos escindibles por metaloproteinasas de la matriz incluyen, aunque sin limitarse a: -Gly-Pro-Y-Gly-Pro-Z- (SEQ ID NO:244), -Gly-Pro-, Leu-Gly-Pro-Z- (SEQ ID NO:245), -Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Z- (SEQ ID NO:246), y -Ala-Pro-Gly-Leu-Z- (SEQ ID NO:247), donde Y y Z son aminoácidos. Los ejemplos ilustrativos de secuencias de aminoácidos escindibles por collagenasa incluyen, aunque sin limitarse a: -Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-Z- (SEQ ID NO:248), -Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Z- (SEQ ID NO:249), -Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Trp- (SEQ ID NO:250), -Pro-Leu-Gly-Cys(Me)-His- (SEQ ID NO:251), -Pro-Leu-Gly-Leu-Tyr-Ala- (SEQ ID NO:252), -Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg- (SEQ ID NO:253) y -Pro-Leu-Ala-Tyr-Trp-Ala-Arg- (SEQ ID NO:254), donde Z es un aminoácido. Un ejemplo ilustrativo de una secuencia de aminoácidos escindible por estromelina es -Pro-Tyr-Ala-Tyr-Tyr-Met-Arg- (SEQ ID NO:255); y un ejemplo de una secuencia de aminoácidos escindible por gelatinasa es -Pro-Leu-Gly-Met-Tyr-Ser-Arg- (SEQ ID NO:256).

Los enlazadores enzimáticamente degradables para uso en realizaciones particulares de la presente descripción también incluyen secuencias de aminoácidos que pueden ser escindidas por una enzima convertidora de angiotensina, tales como, por ejemplo, -Asp-Lys-Pro-, -Gly-Asp-Lys-Pro- (SEQ ID NO:257) y -Gly-Ser-Asp-Lys-Pro- (SEQ ID NO:258).

Los enlazadores enzimáticamente degradables para uso en realizaciones particulares de la presente descripción también incluyen secuencias de aminoácidos que pueden ser degradadas por catepsina B, tales como, por ejemplo, Val-Cit, Ala-Leu-Ala-Leu- (SEQ ID NO:259), Gly-Phe-Leu-Gly- (SEQ ID NO:260) y Phe-Lys.

En realizaciones particulares de la presente descripción, un conector liberable tiene una semivida a pH 7,4, 25 °C, por ejemplo, un pH fisiológico, temperatura del cuerpo humano (por ejemplo, *in vivo*, en suero, en un tejido dado), de aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas o aproximadamente 96 horas o más o cualquier semivida intermedia. Un experto en la materia apreciaría que la semivida de un polipéptido conjugado HRS-Fc puede adaptarse a medida de manera precisa usando un enlazador liberable particular.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, sin embargo, uno o más de los enlazadores peptídicos son opcionales. Por ejemplo, las secuencias de enlazador pueden no ser necesarias cuando el primer y el segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácidos N-terminales y/o C-terminales no esenciales que pueden usarse para

separar los dominios funcionales y prevenir la interferencia estérica.

Procedimientos para uso

- 5 Las realizaciones de la presente descripción se refieren al descubrimiento de que los polipéptidos conjugados de región Fc-histidil-ARNt sintetasa (HRS-Fc), y los fragmentos y variantes de los mismos, ofrecen procedimientos mejorados para modular las respuestas inflamatorias de diversas maneras útiles, tanto *in vitro* como *in vivo*. Las composiciones de la presente descripción pueden ser útiles, por lo tanto, como inmunomoduladores para el tratamiento de una amplia gama de indicaciones proinflamatorias, inflamatorias y/o autoinmunitarias, incluyendo las
- 10 respuestas inflamatorias, la inflamación crónica, la inflamación aguda y las enfermedades inmunitarias, modulando las células que median, ya sea directa o indirectamente, dichas enfermedades afecciones y trastornos inflamatorios y/o autoinmunitarios. La utilidad de las composiciones de la presente descripción como inmunomoduladores se puede monitorizar usando cualquiera de una serie de técnicas conocidas y disponibles en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ensayos de migración (por ejemplo, usando leucocitos o linfocitos), ensayos de producción de citocinas o
- 15 ensayos de viabilidad celular o diferenciación celular (por ejemplo, usando linfocitos B, linfocitos T, monocitos o linfocitos NK).

La «inflamación» se refiere en general a la respuesta biológica de los tejidos a estímulos perjudiciales, tales como patógenos, células dañadas (por ejemplo, heridas) e irritantes. La expresión «respuesta inflamatoria» se refiere a los

20 mecanismos específicos mediante los cuales se consigue y regula la inflamación, incluyendo, simplemente a modo de ilustración, activación o migración de las células inmunitarias, migración, autoinmunidad y enfermedad autoinmunitaria, producción de citocinas, vasodilatación, incluyendo liberación de quinina, fibrinólisis y coagulación, entre otros descritos en el presente documento y conocidos en la técnica. Idealmente, la inflamación es un intento de protección por parte del cuerpo tanto para eliminar los estímulos perjudiciales como para iniciar el proceso de

25 curación del tejido o tejidos afectados. En ausencia de inflamación, las heridas e infecciones nunca se curarían, creando una situación donde la destrucción progresiva del tejido amenazaría la supervivencia. Por otro lado, la inflamación excesiva o crónica puede asociarse con diversas enfermedades, tales como la fiebre del heno, la aterosclerosis y la artritis reumatoide, entre otras descritas en el presente documento y conocidas en la técnica.

30 Los signos clínicos de la inflamación crónica dependen de la duración de la enfermedad, las lesiones inflamatorias, la causa y la zona anatómica afectada (ver, por ejemplo, Kumar y col., Robbins Basic Pathology-8th Ed., 2009 Elsevier, Londres; Miller, LM, Pathology Lecture Notes, Atlantic Veterinary College, Charlottetown, PEI, Canadá). La inflamación crónica se asocia con diversas afecciones o enfermedades patológicas, incluyendo, por ejemplo, alergias, enfermedad de Alzheimer, anemia, estenosis de la válvula aórtica, artritis tal como artritis reumatoide y

35 osteoartritis, cáncer, insuficiencia cardíaca congestiva, fibromialgia, fibrosis, ataque cardíaco insuficiencia renal, lupus, pancreatitis, accidente cerebrovascular, complicaciones quirúrgicas, enfermedad pulmonar inflamatoria, enfermedades inflamatorias del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU), aterosclerosis, trastornos neurológicos, diabetes, trastornos metabólicos, obesidad y psoriasis, entre otras descritas en el presente documento y conocidas en la técnica. Muchas otras enfermedades crónicas también pueden incluir un

40 componente inflamatorio y, por lo tanto, pueden tratarse con los conjugados HRS-Fc de la presente descripción, incluyendo, por ejemplo, distrofias musculares y rabdomiolisis. Por lo tanto, los conjugados HRS-Fc pueden usarse para tratar o gestionar inflamación crónica, modular cualquiera de una o más de las respuestas inflamatorias crónicas individuales, o tratar una o más enfermedades o afecciones asociadas con la inflamación crónica.

45 Ciertas respuestas inflamatorias específicas incluyen la producción y actividad de citocinas y rutas relacionadas. Por ejemplo, ciertas realizaciones ejemplares de la presente descripción se refieren a la modulación de la señalización celular a través del factor nuclear-kB (NF-kB), tal como aumentando las actividades aguas abajo de este factor de transcripción. En ciertos aspectos, los aumentos en la actividad de NF-kB pueden causar a aumentos en la señalización o actividad de citocinas, tales como citocinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF-alfa o beta) y citocinas

50 antiinflamatorias (por ejemplo, IL-10).

Criterios para evaluar los signos y síntomas de afecciones inflamatorias y otras, incluso para fines de diagnóstico diferencial y también para monitorizar tratamientos, tales como determinar si se ha administrado una dosis terapéuticamente efectiva en el ciclo de tratamiento, por ejemplo, determinando la mejoría de acuerdo con criterios

55 clínicos aceptados, serán evidentes para los expertos en la materia y se ejemplifican con las enseñanzas de, por ejemplo, Berkow y col., eds., The Merck Manual, 16ª edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Goodman y col., eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (2001); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3ª edición, ADIS Press, Ltd., Williams and Wilkins, Baltimore, MD. (1987); Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and

60 Co., Boston, (1985); Osolci al., eds., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Co.,

Easton, PA (1990); Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, Appleton and Lange, Norwalk, CT (1992).

También se incluyen procedimientos para modular una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria innata o adaptativa mediante el uso de cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión «respuesta inmunitaria» incluye una reacción medible u observable a un antígeno, una composición de vacuna o una molécula inmunomoduladora mediada por una o más células del sistema inmunitario. Una respuesta inmunitaria generalmente comienza con un antígeno o una molécula inmunomoduladora que se une a una célula del sistema inmunitario. Una reacción a un antígeno o molécula inmunomoduladora puede estar mediada por muchos tipos de células, incluyendo una célula que inicialmente se une a un antígeno o molécula inmunomoduladora y células que participan en la mediación de una respuesta inmunitaria innata, humoral, mediada por células.

- También se incluyen procedimientos de tratamiento de enfermedades inmunitarias. Las enfermedades, trastornos o afecciones ilustrativas del sistema inmunitario que pueden tratarse de acuerdo con la presente descripción incluyen, aunque sin limitarse a, inmunodeficiencias primarias, trombocitopenia mediada por el sistema inmunitario, síndrome de Kawasaki, trasplante de médula ósea (por ejemplo, trasplante reciente de médula ósea en adultos o niños), leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, infección por VIH (por ejemplo, infección por VIH en adultos o pediátrica), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, púrpura postransfusional y similares.

- 20 Adicionalmente, otras enfermedades, trastornos y afecciones que pueden tratarse con cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento incluyen el síndrome de Guillain-Barré, anemia (por ejemplo, anemia asociada con parvovirus B19, pacientes con mieloma múltiple estable que tienen un alto riesgo de infección (por ejemplo, infección recurrente), anemia hemolítica autoinmunitaria (por ejemplo, anemia hemolítica autoinmunitaria de tipo cálido), trombocitopenia (por ejemplo, trombocitopenia neonatal) y neutropenia mediada por el sistema inmunitario, trasplante (por ejemplo, receptores negativos para citomegalovirus (CMV) de órganos positivos para CMV), hipogammaglobulinemia (por ejemplo, neonatos hipogammaglobulinémicos con factor de riesgo de infección o morbilidad), epilepsia (por ejemplo, epilepsia intratable), síndromes vasculíticos sistémicos, miastenia grave (por ejemplo, descompensación en miastenia grave) dermatomiositis y polimiositis.

- 30 Otras enfermedades, trastornos y afecciones autoinmunitarias que pueden tratarse con cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento incluyen, aunque sin limitarse a, anemia hemolítica autoinmunitaria, trombocitopenia neonatal autoinmunitaria, púrpura trombocitopenia idiopática, autoinmunocitopenia, anemia hemolítica, síndrome antifosfolípido, dermatitis, encefalomiелitis alérgica, miocarditis, policondritis recidivante, cardiopatía reumática, glomerulonefritis (por ejemplo, nefropatía por IgA), esclerosis múltiple, neuritis, uveítis, oftalmia, poliendocrinopatías, púrpura (por ejemplo, púrpura de Henloch-Schoenlein) inflamación pulmonar autoinmunitaria, síndrome de Guillain-Barré, diabetes mellitus dependiente de insulina y enfermedad ocular inflamatoria autoinmunitaria.

- Enfermedades, trastornos o afecciones autoinmunitarias adicionales que pueden tratarse con cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento incluyen, aunque sin limitarse a, tiroiditis autoinmunitaria; hipotiroidismo, incluyendo tiroiditis de Hashimoto y tiroiditis caracterizadas, por ejemplo, por citotoxicidad tiroidea mediada por células y humoral; LES (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por complejos inmunitarios circulantes y generados localmente); síndrome de Goodpasture (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos contra la membrana basal); pénfigo (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos acantolíticos epidérmicos); autoinmunidades del receptor como, por ejemplo, enfermedad de Graves (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos contra un receptor de la hormona estimuladora de la tiroides; miastenia grave, que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos para el receptor de acetilcolina); resistencia a la insulina (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos para el receptor de insulina); anemia hemolítica autoinmunitaria (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por la fagocitosis de glóbulos rojos sensibilizados por anticuerpos); y púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por la fagocitosis de plaquetas sensibilizadas por anticuerpos).

- Otras enfermedades, trastornos o afecciones autoinmunitarias que pueden tratarse con cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento incluyen, aunque sin limitarse a, artritis reumatoide (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por complejos inmunitarios en las articulaciones); esclerodermia con anticuerpos anticólageno (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos nucleolares y otros anticuerpos nucleares); enfermedad mixta del tejido conectivo, (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos para antígenos nucleares extraíbles, por ejemplo, ribonucleoproteína); polimiositis/dermatomiositis (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos antihistamínicos sin histona); anemia perniciosa (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos anticélulas parietales, antimicrosomas y antifactor intrínseco); enfermedad de Addison

idiopática (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por citotoxicidad suprarrenal humoral y mediada por células); esterilidad (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos antiespermatozoides); glomerulonefritis (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos contra la membrana basal glomerular o complejos inmunitarios); por glomerulonefritis primaria, por nefropatía por IgA; penfigoide bulloso (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por IgG y complemento en la membrana basal); síndrome de Sjogren (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por múltiples anticuerpos tisulares y/o el anticuerpo antinuclear no histona específico (SS-B)); diabetes mellitus (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos contra células de los islotes mediados por células y humorales); y resistencia farmacológica adrenérgica, incluyendo resistencia farmacológica adrenérgica con asma o fibrosis quística (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos contra receptores beta-adrenérgicos).

Otras enfermedades, trastornos o afecciones autoinmunitarias adicionales que pueden tratarse con cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento incluyen, aunque sin limitarse a, hepatitis crónica activa (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos contra músculo liso); cirrosis biliar primaria (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos antimitocondriales); otra insuficiencia de la glándula endocrina (que se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos tisulares específicos en algunos casos); vitiligo (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos antimelanocitos); vasculitis (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por inmunoglobulina y complemento en las paredes de los vasos y/o bajo complemento de suero); afecciones posinfarto de miocardio (que a menudo se caracterizan, por ejemplo, por anticuerpos antimiocardio); síndrome de cardiotomía (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos antimiocardio); urticaria (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos IgG e IgM contra IgE); dermatitis atópica (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos IgG e IgM contra IgE); asma (que a menudo se caracteriza, por ejemplo, por anticuerpos IgG e IgM contra IgE); miopatías inflamatorias; y otros trastornos inflamatorios, granulomatosos, degenerativos y atróficos.

Enfermedades y trastornos adicionales que pueden tratarse con cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento incluyen aquellos que resultan de o están asociados con un desequilibrio de Th17 u otros subtipos de células Th. Los ejemplos incluyen psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis atópica (eccema), esclerosis concéntrica de Balo, esclerosis difusa de Schilder, EM de Marburg, EII, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por derivación, enfermedad de Behçet, colitis indeterminada, asma, miocarditis autoinmunitaria, endometriosis, trastorno de Still de inicio en adultos (TSIA), púrpura de Schönlein-Henoch (PHS), Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), enfermedad periodontal, insuficiencia de trasplante de órganos, enfermedad de injerto contra huésped y enfermedad de Devic (neuromielitis óptica).

En algunos aspectos de la presente descripción, la presente descripción incluye un procedimiento de reducción de la inflamación muscular o pulmonar asociada con una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición que comprende cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento. Las enfermedades y trastornos inflamatorios musculares ejemplares incluyen distrofias musculares, inflamación muscular inducida por el ejercicio, inflamación asociada con lesión o cirugía muscular, rabdomiólisis y enfermedades y trastornos relacionados como se describen en el presente documento.

También se incluyen procedimientos de tratamiento de una enfermedad asociada con un autoanticuerpo que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una composición terapéutica que comprende cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento, donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo específicamente reconocido por el autoanticuerpo.

Ciertas realizaciones de la presente descripción incluyen procedimientos de inducción de tolerancia a un antígeno de histidil-ARNt sintetasa (HisRS), comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto una composición que comprende cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento, donde el polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo específicamente reconocido por el autoanticuerpo, y donde la administración de la composición causa tolerancia al autoantígeno.

También se incluyen procedimientos para eliminar un conjunto o subconjunto de linfocitos T implicados en una respuesta autoinmunitaria a un autoantígeno de histidil ARNt sintetasa (HisRS), comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto una composición que comprende cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento. El polipéptido de HRS comprende al menos un epítipo específicamente reconocido por el autoanticuerpo, o el linfocito T autorreactivo, y donde la administración de la composición causa la eliminación clonal de linfocitos T autorreactivos.

En otra realización de la presente descripción, la presente descripción incluye un procedimiento para inducir anergia en linfocitos T implicados en una respuesta autoinmunitaria a un autoantígeno de histidil ARNt sintetasa (HRS),

comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto una composición que comprende cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento, donde el polipéptido HRS comprende al menos un epítipo específicamente reconocido por el autoanticuerpo o linfocito T, y donde la administración de la composición causa la inactivación funcional de los linfocitos T implicados en la respuesta autoinmunitaria.

5

En otra realización de la presente descripción, la presente descripción incluye una terapia de sustitución para tratar una enfermedad asociada con una insuficiencia de histidil ARNt sintetasa que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición terapéutica que comprende cualquiera de los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento, donde el polipéptido de HRS compensa funcionalmente la insuficiencia de histidil ARNt sintetasa.

10

En un aspecto de la presente descripción de esta terapia de sustitución, la insuficiencia de histidil ARNt sintetasa es causada por la presencia de anticuerpos anti-Jo-1. En un aspecto de la presente descripción de esta terapia de sustitución, la insuficiencia de histidil ARNt sintetasa está causada por mutaciones en una histidil ARNt sintetasa endógena que modula la actividad, expresión o distribución celular de la histidil ARNt sintetasa endógena. En un aspecto de la presente descripción, la insuficiencia de histidil ARNt sintetasa está asociada con el síndrome de Perrault o el síndrome de Usher.

15

En cualquiera de estos procedimientos, el término «tolerancia» se refiere a la reducción o ausencia sostenida de una respuesta inmunitaria a un antígeno específico en un mamífero, particularmente un ser humano. La tolerancia es distinta de la inmunosupresión generalizada, donde todas, o toda una clase específica de las respuestas inmunitarias mediadas por células inmunitarias, tales como linfocitos B, de respuestas inmunitarias se reducen o eliminan. El desarrollo de la tolerancia puede monitorizarse rutinariamente mediante la ausencia, o una disminución, de la concentración de anticuerpos contra polipéptidos de HRS en el suero del sujeto huésped después de la administración, en dosis únicas o sucesivas del conjugado HRS-Fc de tratamiento. El desarrollo de tolerancia típicamente será suficiente para disminuir los síntomas de la enfermedad autoinmunitaria en el paciente, por ejemplo, un paciente puede haber mejorado suficientemente para mantener las actividades normales en ausencia, o en presencia de cantidades reducidas, de inmunosupresores generales, por ejemplo, corticoides.

20

En cualquiera de estos procedimientos, la tolerancia de las composiciones típicamente será sostenida, lo que significa que tendrá una duración de aproximadamente un mes, aproximadamente dos meses, aproximadamente tres meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses o aproximadamente 6 meses o más. La tolerancia puede dar lugar a una anergia selectiva de los linfocitos B, o una anergia de los linfocitos T o ambas.

30

En cualquiera de estos procedimientos, tratamientos y composiciones terapéuticas, la expresión «una enfermedad asociada con autoanticuerpos específicos para histidil ARNt sintetasa» se refiere a cualquier enfermedad o trastorno en el cual los anticuerpos para histidil ARNt sintetasa se detectan o son detectables, independientemente de si otros autoanticuerpos también se detectan, o se cree que desempeñan un papel en la progresión o la causa de la enfermedad. Los procedimientos para detectar anticuerpos en muestras de pacientes pueden llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento estándar incluyendo, por ejemplo, mediante RIA, ELISA, mediante inmunoprecipitación, mediante tinción de tejidos o células (incluyendo células transfectadas), micromatrices de antígeno, análisis de espec. de masas, ensayos de neutralización específicos o uno de una serie de otros procedimientos conocidos en la técnica para identificar la especificidad por un antígeno deseado. En algunos aspectos de la presente descripción, la especificidad del anticuerpo puede caracterizarse adicionalmente determinando la capacidad de los anticuerpos para unirse selectivamente a diferentes variantes de splicing y formas truncadas o proteolíticas de histidil ARNt sintetasa. Un autoanticuerpo humano relativamente bien conocido para la histidil ARNt sintetasa incluye, por ejemplo, anticuerpos para Jo-1.

40

45

En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos y composiciones divulgados, el polipéptido de HRS o el conjugado HRS-Fc comprende un epítipo de histidil ARNt sintetasa que reacciona específicamente de forma cruzada con un autoanticuerpo asociado a enfermedad para histidil ARNt sintetasa. En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos y composiciones divulgados, el polipéptido de HRS o el conjugado HRS-Fc comprende un epítipo de histidil ARNt sintetasa que reacciona específicamente de forma cruzada con un linfocito T asociado a enfermedad autorreactivo para histidil ARNt sintetasa. En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos y composiciones divulgados, el polipéptido de HRS o el conjugado HRS-Fc comprenden un epítipo que reacciona específicamente de forma cruzada con un autoanticuerpo asociado a enfermedad para otra ARNt sintetasa, o con un autoanticuerpo no para ARNt sintetasa.

50

55

En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos descritos, el polipéptido de HRS o el conjugado HRS-Fc comprenden un epítipo inmunodominante que es reconocido específicamente por la mayoría de los anticuerpos

60

de los sueros de un paciente con una enfermedad asociada con autoanticuerpos para histidil-ARNt sintetasa. En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos descritos, el polipéptido de HRS o el conjugado HRS-Fc comprende un epítipo inmunodominante que es reconocido específicamente por la mayoría de los linfocitos T autorreactivos de los sueros de un paciente con una enfermedad asociada con autoanticuerpos para histidil-ARNt sintetasa.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el epítipo está comprendido dentro del dominio WHEP del polipéptido de HRS (aproximadamente los aminoácidos 1-43 de la SEQ ID NO:1); el dominio de aminoacilación (aproximadamente los aminoácidos 54-398 de la SEQ ID NO:1); o el dominio de unión anticodón (aproximadamente los aminoácidos 406-501 de la SEQ ID NO:1) o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS no comprende un epítipo que reacciona específicamente de manera cruzada con un autoanticuerpo asociado a enfermedad para histidil-ARNt sintetasa. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS no compete significativamente por la unión de un autoanticuerpo asociado a enfermedad para histidil-ARNt sintetasa en un ELISA competitivo hasta una concentración de aproximadamente 1×10^{-7} M. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS no compete significativamente por la unión de un autoanticuerpo asociado a enfermedad para histidil-ARNt sintetasa en un ELISA competitivo hasta una concentración de aproximadamente 5×10^{-7} M. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS no compete significativamente por la unión de un autoanticuerpo asociado a enfermedad para histidil-ARNt sintetasa en un ELISA competitivo hasta una concentración de aproximadamente 1×10^{-6} M.

Por consiguiente, en algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una afinidad más baja por un autoanticuerpo asociado a enfermedad que la histidil-ARNt sintetasa de tipo silvestre (SEQ ID NO:1) de acuerdo con se mide en un ELISA competitivo. En algunas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido de HRS tiene una afinidad aparente por el autoanticuerpo asociado a enfermedad que es al menos aproximadamente 10 veces menos, o al menos aproximadamente 20 veces menos, o al menos aproximadamente 50 veces menos, o al menos aproximadamente 100 veces menos que la afinidad del autoanticuerpo asociado a enfermedad para ser humano de tipo silvestre (SEQ ID NO:1). En un aspecto de la presente descripción, el autoanticuerpo para histidil-ARNt sintetasa se dirige al antígeno Jo-1.

Los ejemplos de enfermedades asociadas con autoanticuerpos específicos para histidil-ARNt sintetasa (así como enfermedades asociadas con una insuficiencia de histidil-ARNt sintetasa) incluyen, sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias y miopatías inflamatorias, incluyendo miopatías inflamatorias idiopáticas, polimiositis, miopatías inducidas por estatinas, dermatomiositis, enfermedad pulmonar intersticial (y otras afecciones fibróticas pulmonares) y trastornos relacionados, tales como superposición de polimiositis-esclerodermia y miositis por cuerpos de inclusión (MCI) y afecciones tales como las que se encuentran en los síndromes anti-sintetasa, incluyendo por ejemplo enfermedad pulmonar intersticial, artritis, dismotilidad esofágica, enfermedad cardiovascular y otras manifestaciones vasculares tales como fenómeno de Reynaud; otros ejemplos de enfermedades asociadas con una insuficiencia de histidil-ARNt sintetasa incluyen trastornos genéticos que dan como resultado una insuficiencia de histidil-ARNt sintetasa activa, incluyendo el síndrome de Usher y el síndrome de Perrault.

La **polimiositis** afecta los músculos esqueléticos (implicados en la realización de movimientos) en ambos lados del cuerpo. Rara vez se ve en personas menores de 18 años; la mayoría de los casos son en personas de 31 a 60 años de edad. Además de los síntomas mencionados anteriormente, la debilidad muscular progresiva causa dificultad para tragar, hablar, levantarse de una posición sentada, subir escaleras, levantar objetos o juntar las manos por encima de la cabeza. Las personas con polimiositis también pueden experimentar artritis, dificultad para respirar y arritmias cardíacas. La polimiositis a menudo se asocia con anticuerpos para sintetasa, incluyendo HisRS, dando como resultado la invasión de células inmunitarias en las células musculares dañadas. Los conjugados HRS-Fc se pueden usar para reducir la activación y la invasión de las células inmunitarias y para tratar la polimiositis.

La **dermatomiositis** se caracteriza por una erupción cutánea que precede o acompaña a la debilidad muscular progresiva. La erupción es de aspecto irregular, con decoloraciones púrpuras o rojas, y se desarrolla característicamente en los párpados y en los músculos utilizados para extender o enderezar las articulaciones, incluyendo nudillos, codos, rodillas y dedos del pie. También pueden aparecer erupciones rojas en la cara, el cuello, los hombros, la parte superior del tórax, la espalda y otras ubicaciones, y puede haber hinchazón en las zonas afectadas. La erupción a veces se produce sin implicación muscular evidente. Los adultos con dermatomiositis pueden experimentar pérdida de peso o décimas de fiebre, tener los pulmones inflamados y ser sensibles a la luz. La dermatomiositis en adultos, a diferencia de la polimiositis, puede acompañar a tumores de mama, pulmón,

genitales femeninos o intestino. Los niños y adultos con dermatomiositis pueden desarrollar depósitos de calcio, que aparecen como protuberancias duras debajo de la piel o en el músculo (llamada calcinosis). La calcinosis se produce con mayor frecuencia de 1 a 3 años después del inicio de la enfermedad, pero puede producirse muchos años después. Estos depósitos se ven con más frecuencia en la dermatomiositis infantil que en la dermatomiositis que comienza en adultos. La dermatomiositis puede estar asociada con enfermedades del colágeno vascular o autoinmunitarias.

En algunos casos de polimiositis y dermatomiositis, los músculos distales (lejos del tronco del cuerpo, como los de los antebrazos y alrededor de los tobillos y las muñecas) pueden verse afectados a medida que avanza la enfermedad. La polimiositis y la dermatomiositis pueden asociarse con enfermedades del colágeno vascular o autoinmunitarias que dan como resultado la invasión de células inmunitarias hacia las células musculares dañadas. Los conjugados HRS-Fc se pueden usar para reducir la activación e invasión de las células inmunitarias y para tratar la dermatomiositis.

La **miositis por cuerpos de inclusión (MCI)** se caracteriza por debilidad y atrofia musculares progresivas. El inicio de la debilidad muscular es generalmente gradual (durante meses o años) y afecta tanto a los músculos proximales como a los distales. La debilidad muscular puede afectar solo un lado del cuerpo. En ocasiones, se ven pequeños orificios llamados vacuolas en las células de las fibras musculares afectadas. Las caídas y los tropiezos suelen ser los primeros síntomas perceptibles de MCI. Para algunas personas, el trastorno comienza con debilidad en las muñecas y los dedos que causa dificultad para pellizcar, abotonar y agarrar objetos. Puede haber debilidad en los músculos de la muñeca y los dedos y atrofia (adelgazamiento o pérdida de masa muscular) de los músculos del antebrazo y los músculos del cuádriceps en las piernas. La dificultad para tragar se produce en aproximadamente la mitad de los casos de MCI. Los síntomas de la enfermedad generalmente comienzan después de los 50 años, aunque la enfermedad puede ocurrir antes. A diferencia de la polimiositis y la dermatomiositis, la MCI se presenta con más frecuencia en hombres que en mujeres. Al igual que con otras distrofias musculares, la MCI también da como resultado una invasión progresiva de células inmunitarias en las células musculares dañadas. Los conjugados HRS-Fc se pueden usar para reducir la activación e invasión de las células inmunitarias y para tratar la MCI.

La **miositis juvenil** tiene algunas similitudes con la dermatomiositis y polimiositis en adultos. Típicamente afecta a niños de 2 a 15 años, con síntomas que incluyen debilidad e inflamación de los músculos proximales, edema (una acumulación anormal de líquidos en los tejidos corporales que causa inflamación), dolor muscular, fatiga, erupciones en la piel, dolor abdominal, fiebre y contracturas (acortamiento crónico de los músculos o tendones alrededor de las articulaciones, causado por la inflamación en los tendones musculares, que evita que las articulaciones se muevan libremente). Los niños con miositis juvenil también pueden tener dificultad para tragar y respirar, y el corazón puede verse afectado. Aproximadamente del 20 al 30 por ciento de los niños con dermatomiositis juvenil desarrollan calcinosis. Los niños afectados pueden no mostrar niveles más altos de lo normal de la enzima creatina cinasa en su sangre, pero tienen niveles más altos de lo normal de otras enzimas musculares. La miositis juvenil también produce una invasión progresiva de células inmunitarias en las células musculares dañadas. Los conjugados HRS-Fc se pueden usar para reducir la activación e invasión de las células inmunitarias y para tratar la miositis juvenil.

Las **miopatías inducidas por estatinas** están asociadas con el uso a largo plazo de estatinas que actúan a través de la inhibición de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCR). Generalmente bien tolerados, estos medicamentos se han descrito como inductores de miotoxicidad. Más recientemente, ha habido informes de pacientes donde las miopatías con estatinas persisten incluso después del cese del fármaco, formulándose la hipótesis de que tienen una causa autoinmunitaria. Los beneficios de las estatinas son indiscutibles en la reducción del riesgo de cardiopatía coronaria y la progresión de la aterosclerosis coronaria. No obstante, las complicaciones asociadas pueden ser potencialmente mortales. En la actualidad, se estima que más de 38 millones de personas en los EE. UU., toman estatinas y se espera que hasta el 7 % (> 2,6 millones) de estas desarrollen síntomas musculares, y hasta el 0,5 % (> 190.000) de estas personas potencialmente desarrollen miopatías potencialmente mortales.

Todas las estatinas pueden causar problemas musculares y el riesgo aumenta junto con los aumentos en su lipofilicidad, la potencia para reducir el colesterol y la dosis. La cerivastatina en particular ha estado implicada como causante de un mayor riesgo y se ha retirado del mercado estadounidense. De las estatinas restantes, la atorvastatina y la simvastatina tienen tasas de miotoxicidad más altas. Otros agentes hipolipemiantes no estatinas, tales como la niacina y los fibratos, también conllevan riesgos de problemas musculares, especialmente cuando se combinan con estatinas. Aunque no es posible predecir qué pacientes tendrán problemas musculares inducidos por estatinas, los problemas musculares previos pueden ser un factor de riesgo y deben considerarse al iniciar el tratamiento con estatinas. Antecedentes familiares de miopatía son relevantes si un paciente puede ser portador de una miopatía genética, ya que podría ser desenmascarado por el estrés añadido del tratamiento con estatinas. Otros

factores de riesgo pueden incluir la edad de más de 80 años, bajo peso corporal, sexo femenino, hipotiroidismo, ciertos defectos genéticos y descendencia asiática, así como el uso concomitante de ciertos medicamentos, incluidos los bloqueadores de los canales de calcio, antibióticos macrólidos, omeprazol, amiodarona, antifúngicos azólicos, antagonistas del receptor de histamina H₂, nefazodona, ciclosporina, inhibidores de la proteasa del VIH, 5 warfarina y zumo de pomelo.

El síntoma muscular más común causado por las estatinas es el dolor muscular o mialgia y se presenta en aproximadamente el 7 % de los usuarios de estatinas. La mialgia puede ser de leve a grave y, a menudo, empeora con la actividad muscular. Si el síntoma es tolerable y la indicación para el tratamiento con estatinas es fuerte, por 10 ejemplo, en un paciente con hipercolesterolemia y un infarto de miocardio reciente, el tratamiento con estatinas continuado puede ser apropiado.

Los niveles iniciales de creatina cinasa (CK) no se recomiendan uniformemente antes del inicio del tratamiento con estatinas por parte de las organizaciones que guían el tratamiento con estatinas, pero los niveles de CK pueden 15 proporcionar información muy útil si posteriormente se desarrollan síntomas musculares. También puede producirse debilidad muscular, y con frecuencia produce fatiga y se combina con dolor y CK elevada. Como la mayoría de las miopatías, la debilidad es más pronunciada proximalmente. Episodios raros de rabdomiolisis también se han producido con el tratamiento con estatinas; estos son mucho menos frecuentes pero pueden ser posiblemente mortales. Los cambios que se pueden observar en la histología muscular que son más típicos de una miopatía por 20 estatinas son fibras negativas de citocromo oxidasa, aumento del contenido de lípidos y fibras rojas irregulares. La miopatía necrotizante autoinmunitaria es una forma rara de miopatía por estatinas. En estos pacientes, la interrupción del medicamento con estatinas no se traduce en recuperación, incluso después de varios meses sin tomar el medicamento. Los pacientes tienen una debilidad predominantemente proximal, a menudo sin dolor.

25 El diagnóstico se basa en los antecedentes médicos del individuo, los resultados de una exploración física y pruebas de fuerza muscular y muestras de sangre que muestran niveles elevados de diversas enzimas musculares y autoanticuerpos. Las herramientas de diagnóstico incluyen la electromiografía para registrar la actividad eléctrica que controla los músculos durante la contracción y en reposo, ecografía para detectar inflamación muscular e imágenes de resonancia magnética para revelar músculo anómalo y evaluar la enfermedad muscular. Una biopsia 30 muscular puede examinarse mediante microscopía para detectar signos de inflamación crónica, muerte de la fibra muscular, deformidades vasculares o cambios específicos del diagnóstico de MCI. Los conjugados HRS-Fc se pueden usar para reducir la activación y la invasión de células inmunitarias en el músculo dañado, y para tratar las miopatías inducidas por estatinas y la rabdomiolisis.

35 La **enfermedad pulmonar intersticial (EPI)** es una categoría amplia de enfermedades pulmonares que incluye más de 130 trastornos caracterizados por cicatrización (es decir, «fibrosis») y/o inflamación de los pulmones. La EPI representa el 15 por ciento de los casos vistos por los neumólogos. La enfermedad pulmonar intersticial (EPI) puede desarrollarse a partir de diversas fuentes, que van desde otras enfermedades hasta factores ambientales. Algunas de las causas conocidas de la EPI incluyen: enfermedad del tejido conectivo o autoinmunitaria, incluyendo, por 40 ejemplo, esclerodermia/esclerosis sistémica progresiva, lupus (lupus eritematoso sistémico), artritis reumatoide y polimiositis/dermatomiositis; y exposiciones ocupacionales y ambientales, incluyendo, por ejemplo, exposición al polvo y ciertos gases, venenos, quimioterapia y radioterapia.

En EPI, el tejido en los pulmones se inflama y/o cicatriza. El intersticio del pulmón incluye el área dentro y alrededor 45 de los pequeños vasos sanguíneos y los alvéolos (sacos de aire) donde tiene lugar el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono. La inflamación y la cicatrización del intersticio alteran este tejido y causan una disminución en la capacidad de los pulmones para extraer oxígeno del aire. Los conjugados HRS-Fc se pueden usar para reducir la activación y la invasión de células inmunitarias en el pulmón dañado, y para tratar la EPI.

50 La progresión de la EPI varía de una enfermedad a otra y de una persona a otra. Debido a que la enfermedad pulmonar intersticial interrumpe la transferencia de oxígeno y dióxido de carbono en los pulmones, sus síntomas generalmente se manifiestan como problemas respiratorios. Los dos síntomas más comunes de la EPI son dificultad para respirar al hacer ejercicio y una tos no productiva.

55 El **síndrome de Usher** es la afección más común que afecta tanto a la audición como a la visión. Los principales síntomas del síndrome de Usher son la pérdida de audición y la retinitis pigmentaria (RP). La RP causa ceguera nocturna y pérdida de la visión periférica (visión lateral) a través de la degeneración progresiva de la retina. A medida que RP avanza, el campo de visión se reduce hasta que solo queda la visión central. Muchas personas con síndrome de Usher también tienen problemas graves de equilibrio. Aproximadamente del 3 al 6 por ciento de todos 60 los niños sordos y otro 3 al 6 por ciento de los niños con problemas de audición tienen el síndrome de Usher. En

países desarrollados como los Estados Unidos, aproximadamente cuatro bebés de cada 100.000 nacimientos tienen el síndrome de Usher. El síndrome de Usher se hereda como un rasgo autosómico recesivo. Varios *loci* genéticos se han asociado con el síndrome de Usher, incluyendo la histidil t-ARN sintetasa (Puffenberger y col., (2012) *PLoS ONE* 7(1) e28936 doi: 10.1371 / journal. pone.0028936).

5

Hay tres tipos clínicos de síndrome de Usher: tipo 1, tipo 2 y tipo 3. En los Estados Unidos, los tipos 1 y 2 son los tipos más comunes. Juntos, representan aproximadamente del 90 al 95 por ciento de todos los casos de niños que tienen síndrome de Usher.

- 10 Los niños con síndrome de Usher de tipo 1 son profundamente sordos al nacer y tienen problemas graves de equilibrio. Debido a los problemas de equilibrio asociados con el síndrome de Usher de tipo 1, los niños con este trastorno tardan en sentarse sin apoyo y, por lo general, no caminan de forma independiente antes de los 18 meses. Habitualmente, estos niños comienzan a desarrollar problemas de visión en la primera infancia, casi siempre cuando cumplen los 10 años. Los problemas de visión generalmente comienzan con dificultades para ver de noche, pero
- 15 tienden a progresar rápidamente hasta que la persona está completamente ciega.

- Los niños con síndrome de Usher de tipo 2 nacen con pérdida auditiva de moderada a grave y un equilibrio normal. Aunque la gravedad de la pérdida auditiva varía, la mayoría de estos niños pueden beneficiarse de los audífonos y pueden comunicarse oralmente. Los problemas de visión en el síndrome de Usher de tipo 2 tienden a progresar más
- 20 lentamente que los del tipo 1, y la aparición de RP a menudo no se manifiesta hasta la adolescencia.

- Los niños con síndrome de Usher de tipo 3 tienen una audición normal al nacer. Aunque la mayoría de los niños con el trastorno tienen un equilibrio de normal a casi normal, algunos pueden desarrollar problemas de equilibrio más adelante. La audición y la vista empeoran con el tiempo, pero la velocidad a la que se deterioran puede variar de
- 25 persona a persona, incluso dentro de la misma familia. Una persona con síndrome de Usher de tipo 3 puede desarrollar pérdida de audición en la adolescencia y, habitualmente, necesitará audífonos en la edad adulta media o tardía. La ceguera nocturna generalmente comienza en algún momento durante la pubertad. Los puntos ciegos aparecen desde la adolescencia tardía hasta la edad adulta temprana y, a mediados de la edad adulta, la persona suele ser legalmente ciega.

30

- El **síndrome de Perrault (SP)** se caracteriza por la asociación de disgenesia ovárica en mujeres con discapacidad auditiva neurosensorial y, en algunos sujetos, anomalías neurológicas, incluyendo ataxia cerebelosa progresiva y déficit intelectual. La prevalencia exacta para el síndrome de Perrault es desconocida, y probablemente se diagnostique de manera insuficiente, particularmente en hombres donde el hipogonadismo no es una característica y
- 35 el síndrome no se detecta. La edad media en el momento del diagnóstico es 22 años después de la presentación con pubertad tardía en mujeres con sordera neurosensorial. Se observaron defectos auditivos en todos los casos menos uno (edad media en el momento del diagnóstico 8 años). La pérdida auditiva es siempre neurosensorial y bilateral, pero la gravedad es variable (leve a profunda), incluso en pacientes afectados de la misma familia. Se ha notificado disgenesia ovárica en todos los casos femeninos, pero no se detectan defectos gonadales en los
- 40 hombres. La amenorrea es generalmente primaria, pero también se ha notificado amenorrea secundaria. El crecimiento tardío (altura por debajo del tercer percentil) se notificó en la mitad de los casos documentados. Se desconoce la frecuencia exacta de las anomalías neurológicas, pero se han notificado nueve mujeres y dos hombres (16 a 37 años de edad) que carecen de anomalías neurológicas. Los signos neurológicos son progresivos y generalmente aparecen más tarde en la vida, sin embargo, se ha observado retraso en la marcha o caídas
- 45 frecuentes y tempranas en pacientes jóvenes con SP. Los signos neurológicos comunes son ataxia, dispraxia, movimientos extraoculares limitados y polineuropatía. También se han notificado algunos casos de escoliosis. La transmisión de SP es autosómica recesiva y recientemente se han identificado mutaciones en la histidil ARNt sintetasa mitocondrial como causantes de disgenesia ovárica y pérdida de audición neurosensorial asociadas con el síndrome de Perrault. (Pierce y col., *PNAS EE. UU.* 108 (16) 6543-6548, 2011).

50

- La **distrofia muscular** se refiere a un grupo de trastornos hereditarios donde la fuerza y la masa muscular disminuyen gradualmente. Todas las distrofias musculares están marcadas por una debilidad muscular que es impulsada por un defecto genético primario en uno o más genes específicos del músculo. Adicionalmente, las distrofias musculares, típicamente tienen un componente inflamatorio variable que impulsa la inflamación muscular y,
- 55 en última instancia, potencia la degeneración de los tejidos musculares. Por consiguiente, los conjugados HRS-Fc se pueden usar para reducir la activación y la invasión de células inmunitarias en el músculo dañado, y para tratar las distrofias musculares. Generalmente se reconocen al menos nueve tipos de distrofias musculares. En algunos aspectos de la presente descripción, la distrofia muscular se selecciona entre la distrofia muscular de Duchenne, la distrofia muscular de Becker, la distrofia muscular de Emery-Dreifuss, la distrofia muscular de la cintura y los
- 60 miembros, la distrofia muscular facioescapulohumeral, la distrofia miotónica, la distrofia muscular oculofaríngea, la

distrofia muscular distal y la distrofia muscular congénita.

Distrofia muscular de Duchenne (DMD): la DMD afecta a los niños pequeños y causa una debilidad muscular progresiva, que habitualmente comienza en las piernas. Esta es la forma más grave de distrofia muscular. La DMD se produce en aproximadamente 1 de cada 3.500 nacimientos masculinos y afecta a aproximadamente 8.000 niños y hombres jóvenes en los Estados Unidos. Una forma más leve se produce en muy pocas mujeres portadoras.

La DMD es causada por mutaciones en el gen que codifica la distrofina, una proteína del subsarcolemma que funciona dentro del complejo de glucoproteínas asociado a la distrofina (DGC) que previene la producción de proteína funcional. La cantidad de distrofina se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (es decir, cuanto menos distrofina esté presente, más grave será el fenotipo). El complejo DGC conecta el citoesqueleto intracelular a la matriz extracelular. La DGC se concentra en las líneas Z del sarcómero y confiere la transmisión de fuerza a través de la fibra muscular. La interrupción de este enlace da como resultado la inestabilidad de la membrana, lo que, en última instancia, conduce a rupturas sarcolémicas. El flujo de calcio extracelular altera procesos moleculares como la contracción muscular y activa la actividad proteolítica. Las fibras musculares afectadas se vuelven necróticas o apoptóticas, y liberan quimioatrayentes mitógenos, que inician procesos inflamatorios. Los ciclos de degeneración y regeneración conducen eventualmente a la pérdida muscular irreversible y al reemplazo por tejido fibrótico y adiposo.

Un niño con distrofia muscular de Duchenne por lo general comienza a mostrar síntomas como un niño en edad preescolar. Las piernas resultan afectadas primero, lo que dificulta el caminar y causa problemas de equilibrio. La mayoría de los pacientes caminan de tres a seis meses después de lo esperado y tienen dificultades para correr. Las contracturas (endurecimiento muscular permanente) generalmente comienzan a la edad de cinco o seis años, más severamente en los músculos de la pantorrilla. Las caídas frecuentes y los huesos rotos son comunes a partir de esta edad. Subir escaleras y levantarse sin ayuda puede llegar a ser imposible a los nueve o diez años, y la mayoría de los niños usan una silla de ruedas para moverse a los 12 años. El debilitamiento de los músculos del tronco alrededor de esta edad a menudo causa escoliosis (una curvatura de la columna vertebral de un lado a otro) y cifosis (una curvatura de adelante hacia atrás).

Una de las debilidades más graves de la DMD es la debilidad del diafragma, la lámina de músculos en la parte superior del abdomen que realiza el trabajo principal de respirar y toser. La debilidad del diafragma causa una reducción de la energía y la resistencia física, y un aumento de infecciones pulmonares debido a la incapacidad de toser de manera efectiva. Los hombres jóvenes con DMD pueden vivir hasta los veinte años, siempre que cuenten con asistencia de ventilación mecánica y una buena higiene respiratoria.

En algunas realizaciones de la presente descripción, un sujeto que tiene DMD se caracteriza por uno o más de los siguientes: un signo de Gower positivo, que refleja el deterioro de los músculos de las extremidades inferiores; niveles altos de creatina cinasa (CPK-MM) en la sangre; errores genéticos en el gen Xp21; o niveles reducidos de ausencia de distrofina, por ejemplo, medidos por biopsia muscular.

Los conjugados HRS-Fc se pueden usar en el tratamiento de la DMD, ya sea solos o en combinación con otras terapias, tales como oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, terapias de omisión de exón tales como Eteplirsén), corticoides, beta2-agonistas, terapia física, asistencia respiratoria, terapias con células madre y terapias de sustitución genética. En algunas realizaciones de la presente descripción, la administración de conjugados HRS-Fc conduce a mejoras estadísticamente significativas en la prueba de marcha de 6 minutos.

Distrofia muscular de Becker (DMB): la DMB afecta a los niños mayores y a los hombres jóvenes, siguiendo un curso más suave que la DMD. La DMB se produce en aproximadamente 1 de cada 30.000 nacimientos masculinos. La distrofia muscular de Becker es una variante menos grave de la distrofia muscular de Duchenne y es causada por la producción de una forma truncada, pero parcialmente funcional, de distrofina.

Los síntomas de la DMB suelen aparecer en la infancia tardía hasta la edad adulta temprana. Aunque la progresión de los síntomas puede ser paralela a la de la DMD, los síntomas generalmente son más leves y el curso es más variable. La escoliosis puede producirse, pero generalmente es más leve y progresa más lentamente. La enfermedad del músculo cardíaco (cardiomiopatía) se produce con más frecuencia en la DMB. Los problemas pueden incluir latidos cardíacos irregulares (arritmias) e insuficiencia cardíaca congestiva. Los síntomas pueden incluir fatiga, dificultad para respirar, dolor en el pecho y mareos. La debilidad respiratoria también se produce, y puede causar necesidad de ventilación mecánica. Los conjugados HRS-Fc pueden usarse en el tratamiento de la DMB, ya sea solos o en combinación con otras terapias.

Distrofia muscular de Emery-Dreifuss (DMED): la DMED afecta a los niños pequeños, causando contracturas y debilidad en las pantorrillas, debilidad en los hombros y la parte superior de los brazos y problemas en la forma en que los impulsos eléctricos viajan a través del corazón para hacerlo latir (defectos de la conducción cardíaca). Hay tres subtipos de distrofia muscular de Emery-Dreifuss, que se distinguen por su patrón de herencia: ligada al cromosoma X, autosómica dominante y autosómica recesiva. La forma ligada al cromosoma X es la más común. Cada tipo varía en prevalencia y síntomas. La enfermedad es causada por mutaciones en el gen LMNA, o más comúnmente, el gen EMD. Ambos genes codifican componentes proteicos de la envoltura nuclear.

La DMED generalmente comienza en la primera infancia, a menudo con contracturas que preceden a la debilidad muscular. La debilidad afecta originalmente al hombro y la parte superior del brazo, junto con los músculos de la pantorrilla, lo que causa una postura del pie caído. La mayoría de los hombres con DMED sobreviven a la mediana edad, aunque un defecto en el ritmo cardíaco (bloqueo cardíaco) puede ser mortal si no se trata con un marcapasos. Los conjugados HRS-Fc se pueden usar en el tratamiento de la DMED, ya sea solos o en combinación con otras terapias.

Distrofia muscular de la cintura y los miembros (DMCM): la DMCM comienza en la infancia tardía hasta la edad adulta temprana y afecta a hombres y mujeres, causando debilidad en los músculos alrededor de las caderas y los hombros. Es la más variable de las distrofias musculares, y ahora se reconocen varias formas diferentes de la enfermedad. Muchas personas con sospecha de DMCM probablemente hayan sido mal diagnosticadas en el pasado y, por lo tanto, la prevalencia de la enfermedad es difícil de estimar. El número de personas afectadas en los Estados Unidos puede ser de unos pocos miles.

Aunque hay al menos media docena de genes que causan los diversos tipos de DMCM, habitualmente se reconocen dos formas clínicas principales de DMCM. Una forma infantil grave es similar en apariencia a la DMD, pero se hereda como un rasgo autosómico recesivo.

La distrofia muscular de la cintura y los miembros de tipo 2B (DMCM2B) es causada por la pérdida de mutaciones de la función en el gen de la disferlina. La disferlina se expresa principalmente en el músculo esquelético y cardíaco, pero también en monocitos, macrófagos y otros tejidos donde se localiza en vesículas citoplasmáticas y la membrana celular. La disferlina parece estar implicada en la fusión y el tráfico de membranas, así como en los procesos de reparación. La DMCM2B es una enfermedad muscular de inicio tardío (adolescentes/adultos jóvenes) que se caracteriza por una progresiva debilidad muscular simétrica y una patología inmunitaria/inflamatoria notablemente agresiva. Las biopsias musculares típicamente muestran una marcada infiltración de células inflamatorias, que consisten principalmente en macrófagos/marcadores de activación de macrófagos (HLA-DR, HLA-ABC, CD86), linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y linfocitos T CD4⁺, junto con la degeneración/regeneración de las fibras musculares. Por consiguiente, los conjugados HRS-Fc se pueden usar para reducir la activación y la invasión de células inmunitarias en el músculo dañado, y para tratar la distrofia muscular de la cintura y los miembros.

Los síntomas de DMCM de inicio en adultos generalmente aparecen en los adolescentes o en los veinte años de una persona, y están marcados por una debilidad progresiva y la atrofia progresiva de los músculos más cercanos al tronco. Pueden producirse contracturas, y la capacidad de caminar generalmente se pierde unos 20 años después del inicio. Algunas personas con DMCM desarrollan una debilidad respiratoria que requiere el uso de un respirador. La esperanza de vida se puede acortar un poco. (Las formas autosómicas dominantes habitualmente se producen más tarde en la vida y progresan de manera relativamente lenta).

Distrofia muscular facioescapulohumeral (FEH): la FEH, también conocida como enfermedad de Landouzy-Dejerine, comienza en la infancia tardía hasta la edad adulta temprana y afecta tanto a hombres como a mujeres, causando debilidad en los músculos de la cara, los hombros y la parte superior de los brazos. Las caderas y las piernas también pueden verse afectadas. La FEH se produce en aproximadamente 1 de cada 20.000 personas y afecta a aproximadamente 13.000 personas en los Estados Unidos.

La FEH varía en su gravedad y edad de inicio, incluso entre miembros de la misma familia. Los síntomas generalmente comienzan en la adolescencia o en los primeros años de la veintena, aunque es posible un inicio en bebés o niños. Los síntomas tienden a ser más graves en aquellos con un inicio más temprano. La enfermedad lleva el nombre de las regiones del cuerpo más afectadas por la enfermedad: los músculos de la cara (facio-), los hombros (escapulo-) y la parte superior de los brazos (humeral). Las caderas y las piernas también pueden verse afectadas. Los niños con FEH a menudo desarrollan sordera parcial o completa.

Se necesitan dos defectos para EFEH, el primero es la eliminación de las repeticiones de D4Z4 y el segundo es una «ganancia de función tóxica» del gen DUX4. El primer síntoma observado es a menudo dificultad para levantar

objetos por encima de los hombros. La debilidad puede ser mayor en un lado que en el otro. La debilidad del hombro también hace que los omóplatos sobresalgan hacia atrás, lo que se denomina aleteo escapular. La EFEH está asociada con la invasión inflamatoria en grupos musculares específicos y, por consiguiente, los conjugados HRS-Fc se pueden usar para reducir la activación y la invasión de células inmunitarias de los músculos dañados y para tratar la EFEH.

Distrofia miotónica: la distrofia miotónica, también conocida como enfermedad de Steinert, afecta tanto a hombres como a mujeres, causando una debilidad generalizada que se observa por primera vez en la cara, los pies y las manos. Se acompaña de la incapacidad de relajar los músculos afectados (miotonía). Los síntomas pueden comenzar desde el nacimiento hasta la edad adulta. La distrofia muscular miotónica de tipo 1 (DM1) es la forma más común de distrofia muscular y afecta a más de 30.000 personas en los Estados Unidos. Es el resultado de la expansión de una repetición corta (CTG) en la secuencia de ADN del gen DMG/KG (proteína cinasa de la distrofia miotónica). La distrofia muscular miotónica de tipo 2 (DM2) es mucho más rara y es el resultado de la expansión de la repetición CCTG en el gen ZNF9 (proteína de dedo de zinc 9).

Los síntomas de la distrofia miotónica incluyen debilidad facial y mandíbula floja, párpados caídos (ptosis) y atrofia muscular progresiva en los antebrazos y las pantorrillas. Una persona con esta distrofia tiene dificultad para relajar su agarre, especialmente si el objeto está frío. La distrofia miotónica afecta al músculo cardíaco, causando arritmias y bloqueo cardíaco, y a los músculos del sistema digestivo, lo que causa trastornos de motilidad y estreñimiento. Otros sistemas corporales también se ven afectados: la distrofia miotónica puede causar cataratas, degeneración de la retina, bajo coeficiente intelectual, calvicie frontal, trastornos de la piel, atrofia testicular, apnea del sueño y resistencia a la insulina. Un aumento en la necesidad o el deseo de dormir es común, al igual que una motivación disminuida. La discapacidad grave afecta a la mayoría de las personas con este tipo de distrofia dentro de los 20 años del inicio, aunque la mayoría no requiere una silla de ruedas incluso en una edad avanzada. Los conjugados HRS-Fc se pueden usar para tratar la distrofia miotónica, por ejemplo, reduciendo la inflamación asociada con el tejido muscular, incluyendo el músculo esquelético (por ejemplo, los músculos del cuádriceps) y/o el tejido cardíaco, entre otros tejidos.

Distrofia muscular oculofaríngea (DMOF): la DMOF afecta a adultos de ambos sexos y causa debilidad en los músculos de los ojos y la garganta. Es más común entre las familias francocanadienses en Quebec y en las familias hispanoamericanas en el suroeste de los Estados Unidos.

La DMOF generalmente comienza en los años treinta o cuarenta de una persona, con debilidad en los músculos que controlan los ojos y la garganta. Los síntomas incluyen párpados caídos, dificultad para tragar (disfagia), y la debilidad progresa hacia otros músculos de la cara, el cuello y, ocasionalmente, las extremidades superiores. La dificultad para tragar puede causar aspiración o la introducción de alimentos o saliva en las vías respiratorias. La neumonía puede seguir. Los conjugados HRS-Fc se pueden usar para tratar la DMOF, por ejemplo, reduciendo la inflamación asociada con el tejido muscular.

Distrofia muscular distal (DD): la DD comienza en la mediana edad o más tarde, causando debilidad en los músculos de los pies y las manos. Es más común en Suecia y rara en otras partes del mundo. La DD suele comenzar en los años veinte o treinta, con debilidad en las manos, antebrazos y parte inferior de las piernas. Dificultad con movimientos finos tales como escribir a máquina o abrochar botones pueden ser los primeros síntomas. Los síntomas progresan lentamente, y la enfermedad generalmente no afecta a la esperanza de vida. Los conjugados HRS-Fc se pueden usar para tratar la DD, reduciendo la inflamación asociada con la inflamación del tejido muscular.

Distrofia muscular congénita (DMC): la DMC está presente desde el nacimiento, produce una debilidad generalizada y, habitualmente, progresa lentamente. Un subtipo, llamado DMC de Fukuyama, también implica retraso mental. Ambos son raros; DMC de Fukuyama es más común en Japón.

La DMC está marcada por una grave debilidad muscular desde el nacimiento, con bebés que muestran «flacidez» y muy poco movimiento voluntario. No obstante, un niño con DMC puede aprender a caminar, con o sin algún dispositivo de asistencia, y vivir hasta la edad adulta temprana o más allá. En contraste, los niños con DMC de Fukuyama rara vez pueden caminar y tienen un retraso mental grave. La mayoría de los niños con este tipo de DMC mueren en la infancia. Al igual que con las otras distrofias musculares, los conjugados HRS-Fc se pueden usar para tratar la DMC, por ejemplo, reduciendo la inflamación asociada con la inflamación del tejido muscular.

Caquexia: la caquexia (o síndrome de atrofia progresiva) se caracteriza típicamente por pérdida de peso, atrofia muscular, fatiga, debilidad y pérdida significativa de apetito en alguien que no está intentando activamente perder

peso. La definición formal de caquexia es la pérdida de masa corporal que no puede revertirse nutricionalmente. Incluso si el paciente afectado consume más calorías, la masa corporal magra se pierde, lo que indica la existencia de una patología primaria.

- 5 La caquexia es experimentada por pacientes con cáncer, SIDA, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, esclerosis múltiple, insuficiencia cardíaca congestiva, tuberculosis, polineuropatía amiloide familiar, envenenamiento por mercurio (acrodinia) y deficiencia hormonal, entre otras enfermedades.

La caquexia también puede ser un signo de diversos trastornos subyacentes, tales como cáncer, acidosis metabólica

- 10 (es decir, disminución de la síntesis de proteínas y aumento del catabolismo de proteínas), ciertas enfermedades infecciosas (por ejemplo, tuberculosis, SIDA), pancreatitis crónica, trastornos autoinmunitarios o adicción a las anfetaminas. La caquexia debilita físicamente a los pacientes hasta un estado de inmovilidad derivado de la pérdida de apetito, astenia y anemia, y la respuesta al tratamiento estándar suele ser deficiente.

- 15 Aproximadamente el 50 % de todos los pacientes con cáncer padecen caquexia. Aquellos con cánceres gastrointestinales y pancreáticos superiores tienen la mayor frecuencia de desarrollo de un síntoma caquético. Además de aumentar la morbilidad y la mortalidad, agravando los efectos secundarios de la quimioterapia y reduciendo la calidad de vida, la caquexia se considera la causa inmediata de muerte de una gran proporción de pacientes con cáncer, que va del 22 % al 40 % de los pacientes. Los síntomas de la caquexia cancerosa incluyen la
20 pérdida progresiva de peso y el agotamiento de las reservas de tejido adiposo y músculo esquelético de huésped. Los enfoques de tratamiento tradicionales incluyen el uso de estimulantes del apetito, antagonistas de 5-HT₃, suplementos de nutrientes e inhibidores de la COX-2.

Aunque la patogenia de la caquexia se entiende de forma deficiente, se espera que estén implicadas múltiples vías

- 25 biológicas, incluyendo citocinas proinflamatorias tales como TNF- α , hormonas neuroendocrinas, IGF-1 y factores específicos de tumores tales como el factor inductor de proteólisis.

Los conjugados HRS-Fc se pueden usar para tratar la caquexia y cualquiera de sus trastornos o complicaciones relacionadas, subyacentes o secundarias. Los conjugados HRS-Fc se pueden usar solos o en combinación con

- 30 otras terapias, tales como la suplementación dietética con una combinación con alto contenido de proteínas, leucina y aceite de pescado, antioxidantes, progestágenos (acetato de megestrol, acetato de medroxiprogesterona) y anticiclooxigenasa 2, estimulantes del apetito, y antagonistas de 5-HT₃, entre otros.

Rabdomiolisis: la rabdomiolisis es la descomposición de las fibras musculares en el tejido muscular esquelético.

- 35 Los productos de descomposición se liberan al torrente sanguíneo, y algunos de estos productos, tales como la mioglobina, son perjudiciales para los riñones y pueden provocar insuficiencia renal.

Los síntomas incluyen dolor muscular, vómitos, confusión, coma o frecuencia y ritmo cardíacos anormales, y su gravedad generalmente depende de la extensión del daño muscular y de si se desarrolla insuficiencia renal. El daño

- 40 a los riñones puede causar disminución o ausencia de producción de orina, generalmente entre 12 y 24 horas después del daño muscular inicial. La inflamación del músculo dañado puede causar el síndrome compartimental o la compresión de los tejidos circundantes, tales como los nervios y los vasos sanguíneos, en el mismo compartimento fascial, y causar la pérdida de sangre y daños en (por ejemplo, pérdida de función) las partes del cuerpo afectadas. Los síntomas de esta complicación incluyen dolor o sensación reducida en la extremidad
45 afectada. Otras complicaciones incluyen la coagulación intravascular diseminada (CID), una perturbación grave en la coagulación de la sangre que puede causar una hemorragia incontrolable.

El daño muscular inicial puede ser causado, por ejemplo, por factores físicos (por ejemplo, lesión por aplastamiento, ejercicio vigoroso), suministro sanguíneo alterado (por ejemplo, trombosis arterial, embolia), metabolismo alterado

- 50 (por ejemplo, estado hiperosmolar hiperglucémico, hiper- e hiponatremia, hipopotasemia, hipocalcemia, hipofosfatemia, cetoacidosis, hipotiroidismo), temperatura corporal alterada (hipertermia, hipotermia), medicamentos y toxinas (por ejemplo, estatinas, medicamentos antipsicóticos, agentes bloqueadores neuromusculares, diuréticos, metales pesados, cicuta, venenos de insecto o de serpientes), abuso de drogas (por ejemplo, alcohol, anfetamina, cocaína, heroína, ketamina, LDS, MDMA), infecciones (por ejemplo, virus de Coxsackie, virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus de Epstein-Barr, infección primaria por VIH, *Plasmodium falciparum*, virus del herpes, *Legionella pneumophila*, salmonela) y daño muscular autoinmunitario (por ejemplo, polimiositis, dermatomiositis). Además, ciertas afecciones hereditarias aumentan el riesgo de rabdomiolisis, incluyendo defectos de glucólisis y glucogenólisis (por ejemplo, enfermedad de McArdle, deficiencia de fosfofructocinasa, enfermedades por
55 almacenamiento de glucógeno VIII, IX, X y XI), defectos del metabolismo de lípidos (por ejemplo, deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa I y II, deficiencia de subtipos de acil CoA deshidrogenasa (por ejemplo, deficiencia de
60

LCAD, SCAD, MCAD, VLCAD, 3-hidroxiacil-coenzima A deshidrogenasa), deficiencia de tiolasa), miopatías mitocondriales (por ejemplo, deficiencia de succinato dehidrogenasa, citocromo c oxidasa y coenzima Q10) y otros, tales como deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, deficiencia de mioadenilato desaminasa y distrofias musculares.

5

La rabdomiólisis habitualmente se diagnostica con análisis de sangre y análisis de orina, y puede indicarse por niveles anormalmente elevados o en aumento de creatinina y urea, disminución de la producción de orina o decoloración marrón-rojiza de la orina. Los tratamientos primarios incluyen fluidos intravenosos, diálisis y hemofiltración.

10

Los conjugados HRS-Fc se pueden usar, por lo tanto, para tratar la rabdomiolisis y cualquiera de sus trastornos o complicaciones relacionadas, secundarias o subyacentes. Los conjugados HRS-Fc se pueden usar solos o en combinación con otras terapias, incluyendo aquellas destinadas a tratar el shock y preservar la función renal. Las terapias ejemplares incluyen la administración de fluidos intravenosos, habitualmente solución salina isotónica (0,9 % en peso por volumen de solución de cloruro de sodio) y terapias de sustitución renal (TSR) tales como hemodiálisis, hemofiltración continua y diálisis peritoneal.

15

Más generalmente, los conjugados HRS-Fc descritos en el presente documento pueden reducir una respuesta inflamatoria, tal como reduciendo la activación, diferenciación, migración o infiltración de células inmunitarias en tejidos seleccionados, aumentando la producción de citocinas antiinflamatorias, o reduciendo la producción o actividad de citocinas proinflamatorias, entre otros mecanismos. Además, ciertos de los presentes procedimientos, bloqueando la unión, la acción o la producción de anticuerpos anti-histidil-ARNt sintetasa o linfocitos T autorreactivos, tienen utilidad para tratar una amplia gama de enfermedades y trastornos autoinmunitarios e inflamatorios asociados con anticuerpos anti-histidil-ARNt sintetasa, otros autoanticuerpos, así como otras causas de insuficiencia de histidil-ARNt sintetasa.

20

25

Formulaciones farmacéuticas, administración y kits

Las realizaciones de la presente descripción incluyen composiciones que comprenden polipéptidos conjugados HRS-Fc formulados en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para administración a una célula, sujeto o animal, ya sea solos o en combinación con una o más modalidades de terapia. También se entenderá que, si se desea, las composiciones de la presente descripción pueden administrarse en combinación con otros agentes también, por ejemplo, otras proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos. Prácticamente no hay límite a otros componentes que también pueden incluirse en las composiciones, siempre que los agentes adicionales no afecten adversamente a los efectos moduladores u otros que se desean conseguir.

30

35

Para la producción farmacéutica, las composiciones terapéuticas de conjugado HRS-Fc estarán típicamente sustancialmente libres de endotoxinas. Las endotoxinas son toxinas asociadas con ciertas bacterias, típicamente bacterias gram negativas, aunque las endotoxinas pueden encontrarse en bacterias gram positivas, tales como *Listeria monocytogenes*. Las endotoxinas más prevalentes son los lipopolisacáridos (LPS) o los lipooligosacáridos (LOS) que se encuentran en la membrana externa de diversas bacterias gram negativas, y que representan una característica patógena crucial en la capacidad de estas bacterias para causar enfermedad. Pequeñas cantidades de endotoxinas en los seres humanos pueden producir fiebre, una disminución de la presión arterial y la activación de la inflamación y la coagulación, entre otros efectos fisiológicos adversos.

40

45

Las endotoxinas pueden detectarse usando técnicas de rutina conocidas en la técnica. Por ejemplo, el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus*, que usa sangre del cangrejo herradura, es un ensayo muy sensible para detectar la presencia de endotoxinas. En esta prueba, niveles muy bajos de LPS pueden causar una coagulación detectable del lisado del *limulus* debido a una potente cascada enzimática que amplifica esta reacción. Las endotoxinas también se pueden cuantificar mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

50

Para estar sustancialmente libre de endotoxinas, los niveles de endotoxinas pueden ser inferiores a aproximadamente 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08, 0,09, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 UE/mg de proteína. Típicamente, 1 ng de lipopolisacárido (LPS) corresponde a aproximadamente 1-10 UE.

55

En ciertas realizaciones de la presente descripción, como se indica en el presente documento, las composiciones de conjugado HRS-Fc tienen un contenido de endotoxina de menos de aproximadamente 10 UE/mg de conjugado HRS-Fc, o menos de aproximadamente 5 UE/mg de conjugado HRS-Fc, menos de aproximadamente 3 UE/mg de conjugado HRS-Fc, o menos de aproximadamente 1 UE/mg de conjugado HRS-Fc o menos de aproximadamente 0,1 UE/mg de conjugado HRS-Fc, o menos de aproximadamente 0,01 UE/mg de conjugado HRS-Fc. En ciertas

60

realizaciones de la presente descripción, como se ha indicado anteriormente, las composiciones farmacéuticas de conjugado HRS-Fc están en un 95 % libres de endotoxinas, preferentemente en un 99 % libres de endotoxinas, y más preferentemente en aproximadamente un 99,99 % libres de endotoxinas basándose en p/p de proteína.

- 5 Las composiciones farmacéuticas que comprenden una dosis terapéutica de un polipéptido conjugado HRS-Fc incluyen todos los homólogos, ortólogos e isoformas naturales de histidil-ARNt sintetasa.

En algunas realizaciones de la presente descripción, las composiciones farmacéuticas pueden comprender un tampón de histidina, que puede estar presente en cualquiera de las composiciones farmacéuticas dentro del
10 intervalo de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM. En algunas realizaciones de la presente descripción, el tampón de histidina puede estar presente a una concentración de aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 3 mM, aproximadamente 4 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, aproximadamente 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 11 mM, aproximadamente 12 mM, aproximadamente 13 mM,
15 aproximadamente 14 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 16 mM, aproximadamente 17 mM, aproximadamente 18 mM, aproximadamente 19 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM o aproximadamente 100 mM, incluyendo todos los números enteros e intervalos entre dichas concentraciones.

20 En un aspecto de la presente descripción, dichas composiciones pueden comprender polipéptidos conjugados HRS-Fc que son sustancialmente monodispersos, lo que significa que las composiciones de conjugado HRS-Fc existen principalmente (es decir, al menos aproximadamente el 90 %, o más) en una forma de peso molecular aparente cuando se evalúa, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaño, dispersión dinámica de la luz o
25 ultracentrifugación analítica.

En otro aspecto de la presente descripción, dichas composiciones tienen una pureza (basándose en proteínas) de al menos aproximadamente el 90 %, o en algunos aspectos de la presente descripción al menos aproximadamente el 95 % de pureza, o en algunas realizaciones de la presente descripción, al menos el 98 % de pureza. La pureza
30 puede determinarse mediante cualquier procedimiento analítico de rutina como se conoce en la técnica.

En otro aspecto de la presente descripción, dichas composiciones tienen un contenido de agregados de alto peso molecular de menos de aproximadamente el 10 %, en comparación con la cantidad total de proteína presente, o en algunas realizaciones de la presente descripción, dichas composiciones tienen un contenido de agregados de alto
35 peso molecular de menos de aproximadamente el 5 %, o en algunos aspectos de la presente descripción, dichas composiciones tienen un contenido de agregados de alto peso molecular de menos de aproximadamente el 3 %, o en algunas realizaciones de la presente descripción un contenido de agregados de alto peso molecular de menos de aproximadamente el 1 %. El contenido de agregados de alto peso molecular se puede determinar mediante una variedad de técnicas analíticas que incluyen, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, dispersión
40 dinámica de la luz o ultracentrifugación analítica.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables de un polipéptido conjugado HRS-Fc. Para una revisión de las sales adecuadas, véase *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use* de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, 2002). Las sales básicas adecuadas se forman a partir de bases que
45 forman sales no tóxicas. Los ejemplos representativos incluyen las sales de aluminio, arginina, benztatina, calcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnesio, meglumina, olamina, potasio, sodio, trometamina y zinc. También se pueden formar hemisales de ácidos y bases, por ejemplo, sales de hemisulfato y hemicalcio. Las composiciones a usar en la presente descripción adecuadas para administración parenteral pueden comprender soluciones acuosas y/o suspensiones estériles de los ingredientes farmacéuticamente activos, que preferentemente
50 se hacen isotónicos con la sangre del receptor, generalmente usando cloruro de sodio, glicerina, glucosa, manitol, sorbitol y similares. Los ácidos orgánicos adecuados para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido palmítico,
55 ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácidos alquilsulfónicos (por ejemplo, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico), ácidos arilsulfónicos (por ejemplo, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido alcanforsulfónico), ácido 4-metilbicio(2.2.2)-octo-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido
60 laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido

mucónico, y similares.

En realizaciones particulares de la presente descripción, el portador puede incluir agua. En algunas realizaciones de la presente descripción, el portador puede ser una solución acuosa de solución salina, por ejemplo, agua que contiene concentraciones fisiológicas de sodio, potasio, calcio, magnesio y cloruro a un pH fisiológico. En algunas realizaciones de la presente descripción, el portador puede ser agua y la formulación puede incluir además NaCl. En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación puede ser isotónica. En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación puede ser hipotónica. En otras realizaciones de la presente descripción, la formulación puede ser hipertónica. En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación puede ser isoosmótica. En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación está sustancialmente libre de polímeros (por ejemplo, polímeros formadores de gel, agentes de aumento de viscosidad poliméricos). En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación está sustancialmente libre de agentes que aumentan la viscosidad (por ejemplo, carboximetilcelulosa, polímeros polianiónicos). En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación está sustancialmente libre de polímeros formadores de gel. En algunas realizaciones de la presente descripción, la viscosidad de la formulación es aproximadamente la misma que la viscosidad de una solución salina que contiene la misma concentración de un conjugado HRS-Fc (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo).

En las composiciones farmacéuticas de la presente descripción, la formulación de excipientes farmacéuticamente aceptables y soluciones portadoras es bien conocida por los expertos en la materia, como es el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas en el presente documento en diversos regímenes de tratamiento, que incluyen, por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, el polipéptido conjugado HRS-Fc tiene una solubilidad que es deseable para el modo particular de administración, tal como administración intravenosa. Los ejemplos de solubilidad deseable incluyen al menos aproximadamente 1 mg/ml, al menos aproximadamente 10 mg/ml, al menos aproximadamente 25 mg/ml y al menos aproximadamente 50 mg/ml.

En ciertas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse mediante administración oral a un sujeto. Por tanto, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un portador comestible, o pueden incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos, o pueden incorporarse directamente al alimento de la dieta.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el suministro de conjugados de HRS-Fc y los procedimientos para su preparación serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia. Dichas composiciones y procedimientos para su preparación se pueden encontrar, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª edición (Mack Publishing Company, 1995).

La administración de una dosis terapéutica de un conjugado HRS-Fc puede realizarse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en las técnicas médicas, incluyendo, por ejemplo, administración oral, intranasal, parenteral que incluye intravítrea, subconjuntival, subcapsular, retrobulbar, supracoroidal intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular, intrasinovial, intraocular, tópica y subcutánea. Los dispositivos adecuados para la administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluyendo microagujas), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

Las formulaciones parenterales son típicamente soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tamponantes (preferentemente a un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, pueden formularse más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca a usar junto con un vehículo adecuado, tal como agua estéril sin pirógenos. La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, por ejemplo, mediante liofilización, puede conseguirse fácilmente usando técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por los expertos en la materia.

Las formulaciones para administración parenteral pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o sostenida. Las composiciones de liberación sostenida incluyen la liberación retardada, modificada, pulsada, controlada, dirigida y programada. Por lo tanto, un conjugado HRS-Fc se puede formular como una suspensión o como un sólido, semisólido o líquido tixotrópico para la administración como un depósito implantado que proporciona una liberación sostenida de conjugados HRS-Fc. Los ejemplos de dichas formulaciones incluyen, sin limitación, endoprótesis vasculares recubiertas de fármaco y semisólidos y suspensiones que comprenden vesículas laminares o micropartículas cargadas de fármaco de ácido poli-(DL-láctico-co-glucólico) (PGLA), poli(DL-láctido-co-glucólido)

(PLG) o poli(lactida) (PLA), hidrogeles (Hoffman AS: Ann. NY Acad. Sci. 944: 62-73 (2001)), sistemas de nanopartículas de poli-aminoácidos, tales como el sistema Medusa desarrollado por Flamel Technologies Inc., sistemas de gel no acuoso, tal como Atrigel, desarrollado por Atrix, Inc., y SABER (acarato de sacarosa, isobutirato de liberación prolongada), desarrollado por Durect Corporation, y sistemas basados en lípidos, tales como DepoFoam, desarrollado por SkyePharma.

Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (patente de Estados Unidos N.º 5.466.468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil capacidad de inyección con jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede facilitarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe ser adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido primero debe hacerse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, un medio acuoso estéril que puede emplearse será conocido por los expertos en la materia a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosis puede disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de líquido hipodermoclítico o inyectarse en el lugar propuesto para la infusión (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15ª edición, págs. 1035-1038 y 1570-1580). Una cierta variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y pureza generales que exigen los estándares de la Oficina de Productos Biológicos de la FDA.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con los otros ingredientes enumerados anteriormente, conforme sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución del mismo filtrada previamente estéril.

Las composiciones divulgadas en el presente documento pueden formularse en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Como se usa en el presente documento, «portador» incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de

dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, tampones, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en la composición terapéutica. Principio activos suplementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

La frase «farmacéuticamente aceptable» se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como principio activo se entiende bien en la técnica. Típicamente, dichas composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse.

Los polipéptidos conjugados de HRS-Fc para uso en la presente descripción también pueden administrarse por vía tópica, (intra)dérmica o transdérmica a la piel, mucosa o superficie del ojo, ya sea solos o en combinación con uno o más antihistamínicos, uno o más antibióticos, uno o más agentes antifúngicos, uno o más bloqueadores beta, uno o más agentes antiinflamatorios, uno o más agentes antineoplásicos, uno o más agentes inmunosupresores, uno o más agentes antivirales, uno o más agentes antioxidantes u otros agentes activos. Las formulaciones para administración tópica y ocular pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen la liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Las formulaciones típicas para este fin incluyen geles, hidrogeles, lociones, soluciones, colirios, cremas, pomadas, polvos de espolvorear, apósitos, espumas, películas, parches cutáneos, obleas, implantes, esponjas, fibras, vendas y microemulsiones. También se pueden usar liposomas. Los portadores típicos incluyen alcohol, agua, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, glicerina, polietilenglicol y propilenglicol. Pueden incorporarse potenciadores de la penetración, véase, por ejemplo, Finnin y Morgan: *J. Pharm. Sci.* 88 (10): 955-958, (1999). Otros medios de administración tópica incluyen el suministro por electroporación, iontoforesis, fonoforesis, sonoforesis e inyección con microagujas o sin agujas (por ejemplo, los sistemas comercializados con las marcas comerciales POWDERJECT™, BIOJECT™).

Los ejemplos de antihistamínicos incluyen, aunque sin limitarse a, loradatina, hidroxizina, difenhidramina, clorfeniramina, bromfeniramina, ciproheptadina, terfenadina, clemastina, triprolidina, carbinoxamina, difenilpiralina, fenindamina, azatadina, tripelenamina, dexclorfeniramina, dextbromfeniramina, metdilazina y trimprazina, doxilamina, feniramina, pirilamina, clorciclizina, tonzilamina, y derivados de las mismas.

Los ejemplos de antibióticos incluyen, aunque sin limitarse a, aminoglucósidos (por ejemplo, amikacina, apramicina, arbekacina, bambermicinas, butirosina, dibekacina, dihidroestreptomocina, fortimicina(s), gentamicina, isepamicina, kanamicina, micronomicina, neomicina, undecilenato de neomicina, netilmicina, paromomicina, ribostamicina, sisomicina, espectinomocina, estreptomocina, tobramicina, trospectomicina), anfenicoles (por ejemplo, azidanfenicol, cloranfenicol, florfenicol, tianfenicol), ansamicinas (por ejemplo, rifamida, rifampicina, rifamicina sv, rifapentina, rifaximina), lactamas (por ejemplo, carbacefemos (por ejemplo, loracarbef), carbapenemos (por ejemplo, biapenem, imipenem, meropenem, panipenem), cefalosporinas (por ejemplo, cefaclor, cefadroxil, cefamandol, cefatrizina, cefazedona, cefazolina, cefcapeno pivoxil, cefclidina, cefdinir, cefditoren, cefepima, cefetamet, cefixima, cefmenoxima, cefodizima, cefonicid, cefoperazona, ceforanida, cefotaxima, cefotiam, cefozopran, cefpimizol, cefpiramida, cefpiroma, cefpodoxima proxetil, cefprozil, cefroxadina, cefsulodina, ceftazidima, cefteteram, ceftexol, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, cefuroxima, cefuzonam, cefacetilo sódico, cefalexina, cefaloglicina, cefaloridina, cefalosporina, cefalotina, cefapirina sódica, cefradina, pivcefalexina), cefamicinas (por ejemplo, cefbuperazona, cefmetazol, cefminox, cefotetan, cefoxitina), monobactamas (por ejemplo, aztreonam, carumonam, tigemonam), oxacefemas, flomoxef, moxalactama), penicilinas (por ejemplo, amdinocilina, amdinocilina pivoxil, amoxicilina, ampicilina, apalcilina, aspoxicilina, azidocilina, azlocilina, bacampicilina, ácido bencilpenicilínico, bencilpenicilina sódica, carbenicilina, carindacilina, clometocilina, cloxacilina, ciclacilina, dicloxacilina, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, hetacilina, lenampicilina, metampicilina, metilicina sódica, mezlocilina, nafcilina sódica, oxacilina, penamecilina, yodhidrato de penetamato, penicilina g benetamina, penicilina g benzatina, penicilina g benzhidrilamina, penicilina g cálcica, penicilina g hidrabamina, penicilina g potásica, penicilina g procaína, penicilina n, penicilina o, penicilina v, penicilina v benzatina, penicilina v hidrabamina, penimepicilina, feneticilina potásica, piperacilina, pivampicilina, propicilina, quinacilina, sulbenicilina, sultamicilina, talampicilina, temocilina, ticarcilina), otros (por ejemplo, ritipenem), lincosamidas (por ejemplo, clindamicina, lincomicina), macrólidos (por ejemplo, azitromicina, carbomicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, acistrato de eritromicina, estolato de eritromicina, glucoheptonato de eritromicina, lactobionato de eritromicina, propionato de eritromicina, estearato de eritromicina, josamicina, leucomicinas, midecamicinas, miokamicina, oleandomicina, primicina, rokitamicina, rosaramicina,

roxitromicina, espiramicina, troleandomicina), polipéptidos (por ejemplo, anfomicina, bacitracina, capreomicina, colistina, enduracidina, enviomicina, fusafungina, gramicidina s, gramicidina(s), mikamicina, polimixina, pristinamicina, ristocetina, teicoplanina, tiostreptona, tuberactinomicina, tirocidina, tirotricina, vancomicina, viomicina, virginiamicina, bacitracina de zinc), tetraciclinas (por ejemplo, apiciclina, clortetraciclina, clomociclina, demeclociclina, doxiciclina, guameciclina, limeciclina, meclociclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, penimepiciclina, pipaciclina, rolitetraciclina, sanciclina, tetraciclina) y otros (por ejemplo, cicloserina, mupirocina, tuberina). 2.4-diaminopirimidinas (por ejemplo, brodimoprima, tetroxoprima, trimetoprima), nitrofuranos (por ejemplo, furaltadona, cloruro de furazolio, nifuradeno, nifuratel, nifurfolina, nifurpirinol, nifurprazina, nifurtinol, nitrofurantoina), quinolonas y análogos (por ejemplo, cinoxacina, ciprofloxacina, clinafloxacina, difloxacina, enoxacina, fleroxacina, flumequina, grepafloxacina, lomefloxacina, miloxacina, nadifloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, ofloxacina, ácido oxolínico, pazufloxacina, pefloxacina, ácido pipemídico, ácido piromídico, rosoxacina, rufloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, tosufloxacina, trovafloxacina), sulfonamidas (por ejemplo, acetil sulfametoxipirazina, pencilsulfamida, cloramina-b, cloramina-t, dicloramina t, n²-formilsulfisomidina, mafenida, 4'-(metilsulfamoil)sulfanilánilida, noprilsulfamida, ftalilsulfacetamida, ftalilsulfatiazol, salazosulfadimidina, succinilsulfatiazol, sulfabenzamida, sulfacetamida, sulfaclopiridazina, sulfacrisoidina, sulfacitina, sulfadiazina, sulfadicramida, sulfadimetoxina, sulfadoxina, sulfatetol, sulfaguanidina, sulfaguanol, sulfaleno, ácido sulfalóxico, sulfamerazina, sulfámetro, sulfametazina, sulfametizol, sulfametomidina, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina, sulfametrol, sulfamidocrisoidina, sulfamoxol, sulfanilamida, ácido 4-sulfanilamidosalicílico, n⁴-sulfanililsulfanilamida, sulfanililurea, n-sulfanilil-3,4-xilamida, sulfanítán, sulfaperina, sulfafenazol, sulfaproxilina, sulfapirazina, sulfapiridina, sulfasomizol, sulfasimazina, sulfatiazol, sulfatourea, sulfatolamida, sulfisomidina, sulfisoxazol) sulfonas (por ejemplo, acedapsona, acediasulfona, acetosulfona sódica, dapsona, diatiosulfona, glucosulfona sódica, solasulfona, sucisulfona, ácido sulfanílico, p-sulfanililbencilamina, sulfoxona sódica, tiazolsulfona) y otros (por ejemplo, clofoctol, hexedina, metenamina, anhidrometilencitrato de metenamina, hipurato de metenamina, mandelato de metenamina, sulfosalicilato de metenamina, nitroxolina, taurolidina, xibornol).

Los ejemplos de agentes antifúngicos incluyen, aunque sin limitarse a, polienos (por ejemplo, anfotericina b, candicidina, dermostatina, filipina, fungicromina, hachimicina, hamicina, lucensomicina, mepartricina, natamicina, nistatina, pecilocina, perimicina), otros, (por ejemplo, azaserina, griseofulvina, oligomicinas, undecilenato de neomicina, pirrolnitrina, siccanina, tubercidina, viridina), alilaminas (por ejemplo, butenafina, naftifina, terbinafina), imidazoles (por ejemplo, bifonazol, butoconazol, clordantoina, clormidazol, cloconazol, clotrimazol, econazol, enilconazol, fenticonazol, flutrimazol, isoconazol, ketoconazol, lanconazol, miconazol, omoconazol, nitrato de oxiconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol), tiocarbamatos (por ejemplo, tolclato, tolindato, tolnaftato), triazoles (por ejemplo, fluconazol, itraconazol, saperconazol, terconazol) otros (por ejemplo, acrisorcina, amorolfina, bifenamina, bromosaliclorcloranilida, buclosamida, propionato de calcio, clorfenesina, ciclopirox, cloxiquina, coparafinato, diclorhidrato de diamtazol, exalamida, flucitosina, haletazol, hexetidina, loflucarbán, nifuratel, yoduro de potasio, ácido propiónico, piritona, salicilanilida, propionato de sodio, sulbentina, tenonitrozol, triacetina, ujtión, ácido undecilénico, propionato de zinc).

Los ejemplos de bloqueadores beta incluyen, aunque sin limitarse a, acebutolol, atenolol, labetalol, metoprolol, propranolol, timolol y derivados de los mismos.

Los ejemplos de agentes antineoplásicos incluyen, aunque sin limitarse a, antibióticos y análogos (por ejemplo, aclacinomicinas, actinomicina f₁, antramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carubicina, carzinofilina, cromicicinas, dactinomicina, daunorubicina, 6-diazo-5 norleucina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, menogarilo, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, pirarubicina, plicamicina, porfiromicina, puomicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, zinostatina, zorubicina), antimetabolitos (por ejemplo, análogos de ácido fólico (por ejemplo, denopterina, edatrexato, metotrexato, piritrexima, pteropterina, Tomudex®, trimetrexato), análogos de purina, (por ejemplo, cladribina, fludarabina, 6-mercaptapurina, tiampirina, tioguanina), análogos de pirimidina (por ejemplo, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, doxifluridina, emitefur, enocitabina, floxuridina, fluorouracilo, gemcitabina, tagafur).

Los ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen, aunque sin limitarse a, agentes antiinflamatorios esteroideos y agentes antiinflamatorios no esteroideos. Los agentes antiinflamatorios esteroideos ejemplares incluyen acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, clobetasona, clorcortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluzacort, flucoronida, flumetasona, flunisolida, fluocinolona acetónida, fluocinonida, fluocortin butilo, fluocortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednido, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, etabonato de loteprednol, mazipredona, medrisona, meprednisona,

metilprednisolona, furoato de mometasona, parametasona, prednicarbato, prednisolona, 25-dietilamino-acetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, prednisona, prednival, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, triamcinolona acetónida, triamcinolona benetonida y triamcinolona hexacetónida.

- 5 Los agentes antiinflamatorios no esteroideos ejemplares incluyen derivados del ácido aminoarilcarboxílico (por ejemplo, ácido enfenámico, etofenamato, ácido flufenámico, isonixina, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico, talniflumato, terofenamato, ácido tolfenámico), derivados del ácido arilacético (por ejemplo, aceclofecaco, acemetacina, alclofenaco, amfenaco, amtolmetin guacil, bromfenaco, bufexamaco, cinmetacina, clopiraco, diclofenaco de sodio, etodolaco, felbinaco, ácido fenclózico, fentiazaco, glucametacina, ibufenaco, indometacina, isofezolaco, isoxepaco, lonazolaco, ácido metiazínico, mofezolaco, oxametacina, pirazolaco, proglumetacina, sulindaco, tiaramida, tolmetina, tropesina, zomepiraco), derivados del ácido arilbutírico (por ejemplo, bumadizona, butibufeno, fenbufeno, xenbucina), ácidos arilcarboxílicos (por ejemplo, clidanaco, ketorolaco, tinoridina), derivados del ácido arilpropiónico (por ejemplo, alminoprofeno, benoxaprofeno, bermoprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, fenoprofeno, flunoxaprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, ibuproxam, indoprofeno, ketoprofeno, loxoprofeno, naproxeno, oxaprozina, piketoprofeno, pirprofeno, pranoprofeno, ácido protizínico, suprofeno, ácido tiaprofénico, ximoprofeno, zaltoprofeno), pirazoles (por ejemplo, difenamizol, epirizol), pirazonas (por ejemplo, apazona, benzpiperilona, feprazona, mofebutazona, morazona, oxifenbutazona, fenilbutazona, pipebuzona, propifenazona, ramifenazona, suxibuzona, tiazolinobutazona), derivados del ácido salicílico (por ejemplo, acetaminosalol, aspirina, benorilato, bromosaligenina, acetilsalicilato de calcio, diflunisal, etersalato, fendosal, ácido gentísico, salicilato de glicol, salicilato de imidazol, acetilsalicilato de lisina, mesalamina, salicilato de morfina, 1-naftil salicilato, olsalazina, parsalmida, acetilsalicilato de fenilo, salicilato de fenilo, salacetamida, salicilamida ácido o-acético, ácido salicilsulfúrico, salsalato, sulfasalazina), tiazincarboxamidas (por ejemplo, ampiroxiam, droxicam, isoxicam, lornoxicam, piroxicam, tenoxicam), ácido ϵ -acetamidocaproico, s-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, amixetrina, bendazac, bencidamina, bucoloma, difenpiramida, ditazol, emorfazona, fepradinol, guaiazuleno, nabumetona, nimesulida, oxaceprol, paranilina, perisoxal, proquazona, superóxido dismutasa, tenidap y zileutón.

Los ejemplos de agentes antivirales incluyen interferón gamma, zidovudina, clorhidrato de amantadina, ribavirina, aciclovir, valciclovir, didesoxicitidina, ácido fosfonofórmico, ganciclovir y derivados de los mismos.

- 30 Los ejemplos de agentes antioxidantes incluyen ascorbato, alfa-tocoferol, manitol, glutatión reducido, diversos carotenoides, cisteína, ácido úrico, taurina, tirosina, superóxido dismutasa, luteína, zeaxantina, criotpxantina, astazantina, licopeno, N-acetil-cisteína, carnosina, gamma-glutamilcisteína, quercitina, lactoferrina, ácido dihidrolipoico, citrato, extracto de Ginkgo Biloba, catequinas del té, extracto de arándano, vitaminas E o ésteres de vitamina E, palmitato de retinilo y derivados de los mismos. Otros agentes terapéuticos incluyen escualamina, inhibidores de la anhidrasa carbónica, agonistas del receptor adrenérgico alfa-2, antiparasitarios, antifúngicos y derivados de los mismos.

- 40 La dosis exacta de cada componente administrado diferirá, por supuesto, dependiendo de los componentes específicos prescritos, del sujeto que está siendo tratado, de la gravedad de la enfermedad, por ejemplo, la gravedad de la reacción inflamatoria, de la forma de administración y del criterio del médico prescriptor. Por lo tanto, debido a la variabilidad de paciente a paciente, las dosis dadas anteriormente son una guía y el médico puede ajustar las dosis de los compuestos para conseguir el tratamiento que el médico considere apropiado.

- 45 Como entenderá el experto en la materia, para formulaciones de conjugados HRS-Fc donde el portador incluye un polímero formador de gel, en ciertas formulaciones, la inclusión de una o más sales, en particular solución salina, está contraindicada, ya que la inclusión de sal puede causar la solución a gel antes de la administración tópica, como con ciertos polímeros formadores de gel *in situ* (por ejemplo, gel de goma gellan), o la inclusión de sales puede inhibir las propiedades gelificantes del polímero formador de gel. El experto en la materia podrá seleccionar combinaciones apropiadas basándose en las propiedades deseadas de la formulación y las características de los polímeros formadores de gel conocidos en la técnica.

- Los expertos en la materia entenderán las soluciones salinas acuosas adecuadas y estas pueden incluir, por ejemplo, soluciones a un pH de aproximadamente pH 4,5 a aproximadamente pH 8,0. En variaciones adicionales de soluciones acuosas (donde el agua está incluida en el portador), el pH de la formulación está entre cualquiera de aproximadamente 6 y aproximadamente 8,0; entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7,5; entre aproximadamente 6 y aproximadamente 7,0; entre aproximadamente 6,2 y aproximadamente 8; entre aproximadamente 6,2 y aproximadamente 7,5; entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8; entre aproximadamente 6,2 y aproximadamente 7,2; entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0; entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7,5; entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 8,0; entre

- aproximadamente 6,1 y aproximadamente 7,7; entre aproximadamente 6,2 y aproximadamente 7,6; entre aproximadamente 7,3 y aproximadamente 7,4; aproximadamente 6,0; aproximadamente 7,1; aproximadamente 6,2; aproximadamente 7,3; aproximadamente 6,4; aproximadamente 6,5; aproximadamente 6,6; aproximadamente 6,7; aproximadamente 6,8; aproximadamente 6,9; aproximadamente 7,0; aproximadamente 7,1; aproximadamente 7,2; aproximadamente 7,3; aproximadamente 7,4; aproximadamente 7,5; aproximadamente 7,6; o aproximadamente 8,0.
- 5 En algunas variaciones, la formulación de conjugado HRS-Fc tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0. En algunas variaciones, la formulación tiene un pH de aproximadamente 7,4. En variaciones particulares, la formulación tiene un pH de aproximadamente 6,2 a aproximadamente 7,5.
- 10 En ciertas realizaciones de la presente descripción, la concentración de la sal (por ejemplo, NaCl) será, por ejemplo, de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 0,9 % (p/v). Por ejemplo, la concentración de sal puede ser de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 0,9 %, de aproximadamente el 0,02 % a aproximadamente el 0,9 %, de aproximadamente el 0,03 % a aproximadamente el 9 %, de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 0,9 % de aproximadamente el 0,07 % a aproximadamente el 0,9 %, de aproximadamente el 0,09 % a
- 15 aproximadamente el 0,9 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 0,9 % de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 0,9 %, de aproximadamente el 0,3 % a aproximadamente el 0,9 %, de aproximadamente el 0,4 % a aproximadamente el 0,9 % de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 0,9 %, de aproximadamente el 0,6 % a aproximadamente el 0,9 %, de aproximadamente el 0,7 % a aproximadamente el 0,9 %, de aproximadamente el 0,8 % a aproximadamente el 0,9 %, aproximadamente el 0,9 %, aproximadamente el
- 20 0 %, de aproximadamente el 0,05 %, aproximadamente el 0,01 %, aproximadamente el 0,09 %, aproximadamente el 0,1 %, aproximadamente el 0,2 %, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,6 %, aproximadamente el 0,7 % o aproximadamente el 0,8 %. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la solución salina acuosa será isotónica (por ejemplo, una concentración de NaCl de aproximadamente un 0,9 % de NaCl (p/v)). En ciertas realizaciones de la presente descripción, la solución acuosa
- 25 contendrá una concentración de NaCl de aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,7 %, aproximadamente el 0,8 %, aproximadamente el 0,85, o aproximadamente el 0,75 %. Como se apreciará el experto en la materia, dependiendo de las concentraciones de otros componentes, por ejemplo, cuando los conjugados HRS-Fc están presentes como sales de, la concentración de NaCl u otra sal necesaria para conseguir una formulación adecuada para la administración puede variar.
- 30 En algunas realizaciones de la presente descripción, cuando la formulación está sustancialmente libre de agentes que aumentan la viscosidad, la formulación puede estar sustancialmente libre de agentes que aumentan la viscosidad tales como, aunque sin limitarse a, polímeros polianiónicos, derivados de celulosa solubles en agua (por ejemplo, hipromelosa (también conocida como HPMC, hidroxipropilmetilcelulosa e hidroxipropilcelulosa),
- 35 hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, etc.), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, almidones solubles, etc. En algunas variaciones, la formulación no incorpora un hidrogel u otro agente de retención (por ejemplo, tal como los divulgados en la publicación de patente de Estados Unidos N° 2005/0255144), por ejemplo, donde el hidrogel puede incluir hidrogeles que incorporan homopolímeros; copolímeros (por ejemplo, tetrapolímeros de hidroximetilmetacrilato, etilenglicol, dimetilmetacrilato y ácido metacrílico),
- 40 copolímeros de trimetilencarbonato y ácido poliglicólico, poliglactina 910, gluconato, poli-p-dioxanona, ácido poliglicólico, fieltro de ácido poliglicólico, poli-4-hidroxibutirato, una combinación de poli(L-lactida) y poli(L-lactida-co-glucólido), metacrilato de glicol, poli-DL-lactida o Primacryl); compuestos de celulosa regenerada oxidada, polipropileno y polidioxanona o un compuesto de polipropileno y poligelcaprona; etc. En algunas variaciones, las formulaciones no incluyen uno o más de alcohol polivinílico, hidroxipropilmetilcelulosa, emulsión en aceite de ricino
- 45 de polietilenglicol 400, carboximetilcelulosa sódica, propilenglicol, hidroxipropil guar, carboximetilcelulosa sódica, baselina blanca, aceite mineral, dextrano 70, glicerina, hipromelosa, aceite de linaza, aceites de pescado, ácidos grasos omega 3 y omega 6, luteína o aceite de onagra. En algunas variaciones, las formulaciones no incluyen uno o más de los portadores descritos en la patente de Estados Unidos N.º 4.888.354, por ejemplo, tal como uno o más de ácido oleico, etanol, isopropanol, monooleato de glicerol, dioleato de glicerol, laurato de metilo, propilenglicol,
- 50 propanol o dimetilsulfóxido. En algunas variaciones, las formulaciones están sustancialmente libres de dioleato de glicerol e isopropanol.
- En realizaciones particulares de la presente descripción, el polímero formador de gel puede ser, por ejemplo, un polisacárido. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el polisacárido es goma gellan. La goma gellan se refiere a un heteropolisacárido elaborado por la bacteria *Pseudomonas elodea*, aunque el nombre «goma gellan» se usa más comúnmente en este campo. La goma gellan, en particular la formulación GELRITE® se describe en detalle en la patente de Estados Unidos N.º 4.861.760), en particular en su uso en la formulación de timolol. GELRITE®, una forma clarificada de goma gellan de baja graduación de acetilo, está disponible en el mercado de Merck & Co (Rahway, N.J.) y la goma gellan puede obtenerse comercialmente de, entre otros, CPKelco (Atlanta, Ga.). La
- 60 preparación de polisacáridos tales como la goma gellan se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos

N.º 4.326.053 y 4.326.052.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, el polímero formador de gel está presente a una concentración de aproximadamente el 0,03 % a aproximadamente el 2 % (p/v). En algunas realizaciones de la presente descripción, el polímero formador de gel está presente a una concentración de aproximadamente el 0,03 % a aproximadamente el 1,75 %; de aproximadamente el 0,03 % a aproximadamente el 1,5 %, de aproximadamente el 0,03 % a aproximadamente el 1,25 %, de aproximadamente el 0,03 % a aproximadamente el 1 %, de aproximadamente el 0,03 % a aproximadamente el 0,9 %, de aproximadamente el 0,03 % a aproximadamente el 0,8 %, de aproximadamente el 0,03 % a aproximadamente el 0,7 %, de aproximadamente el 0,03 % a aproximadamente el 0,6 %, de aproximadamente el 0,03 % a aproximadamente el 0,5 %, de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 2 %, de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 1,75 %; de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 1,5 %, de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 1,25 %, de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 1 %, de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 0,9 %, de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 0,8 %, de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 0,7 %, de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 0,6 %, de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 0,5 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 2 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1,75 %; de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1,5 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1,25 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 0,9 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 0,8 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 0,7 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 0,6 %, de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 2 %, de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 1,75 %; de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 1,5 %, de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 1,25 %, de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 1 %, de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 0,9 %, de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 0,8 %, de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 0,7 %, de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 0,6 %, de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 0,5 %, o de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 1,5 %. En algunas realizaciones de la presente descripción, la concentración de polímero formador de gel es aproximadamente el 0,1 %, aproximadamente el 0,2 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,6 %, aproximadamente el 0,8 %, aproximadamente el 1 %.

En realizaciones particulares de la presente descripción, el polímero formador de gel es goma gellan a una concentración de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 2 % (p/v), de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 2 % (p/v), de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1 % (p/v), de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 1 % (p/v) o de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 0,6 % (p/v). En algunas realizaciones de la presente descripción, la concentración de goma gellan es aproximadamente el 0,1 %, aproximadamente el 0,2 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,6 %, aproximadamente el 0,8 %, aproximadamente el 1 %.

En algunas realizaciones de la presente descripción de las formulaciones, la formulación puede incluir componentes adicionales tales como uno o más conservantes, uno o más tensioactivos, o uno o más agentes farmacéuticos. En realizaciones particulares de la presente descripción, la formulación puede incluir componentes adicionales tales como uno o más conservantes, uno o más tensioactivos, uno o más agentes de tonicidad, uno o más agentes tamponantes, uno o más agentes quelantes, uno o más agentes que aumentan la viscosidad, uno o más sales, o uno o más agentes farmacéuticos. En ciertas de estas realizaciones de la presente descripción, la formulación puede incluir (además de un conjugado HRS-Fc (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) y un portador): uno o más conservantes, uno o más agentes tamponantes (por ejemplo, uno, dos, tres, etc.), uno o más agentes quelantes, y una o más sales. En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación puede incluir (además de un conjugado HRS-Fc (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) y un portador): uno o más conservantes, uno o más agentes de tonicidad, uno o más agentes tamponantes, uno o más agentes quelantes, y uno o más agentes que aumentan la viscosidad.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la viscosidad de la formulación es aproximadamente la misma que la viscosidad de una solución salina que contiene la misma concentración de un conjugado HRS-Fc (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo). En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación está sustancialmente libre de polímeros formadores de gel. En ciertas realizaciones de la presente descripción, cuando el portador es agua, la formulación puede incluir adicionalmente uno o más agentes quelantes (por ejemplo, EDTA disódico (EDTA), uno o más conservantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorhexidina, clorobutanol, metilparabeno, alcohol feniletílico, propilparabeno, timerosal, nitrato fenilmercúrico, borato fenilmercúrico, acetato fenilmercúrico o combinaciones de dos o más de los anteriores), sal (por ejemplo, NaCl) y

uno o más agentes tamponantes (por ejemplo, uno o más tampones de fosfato (por ejemplo, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, combinaciones de los mismos, etc.), tampones de citrato, tampones de maleato, tampones de borato y combinación de dos o más de los anteriores).

- 5 En realizaciones particulares de la presente descripción, el agente quelante es EDTA disódico, el conservante es cloruro de benzalconio, la sal es NaCl y los agentes tamponantes son fosfato de sodio dibásico y fosfato de sodio monobásico. En ciertas de estas realizaciones de la presente descripción, la formulación está sustancialmente libre de polímero. En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación está sustancialmente libre de uno o más agentes que aumentan sustancialmente la viscosidad (por ejemplo, carboximetilcelulosa, polímeros polianiónicos, etc.). En algunas realizaciones de la presente descripción, la viscosidad de la formulación es aproximadamente la misma que la viscosidad de una solución salina que contiene la misma concentración de un conjugado HRS-Fc (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo). En algunas de estas realizaciones de la presente descripción, la concentración de un conjugado HRS-Fc (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) es de aproximadamente el 0,02 % a aproximadamente el 3 %, de aproximadamente el 0,02 % a aproximadamente el 2 %, de aproximadamente el 0,02 % a aproximadamente el 1 % (p/v). En ciertas realizaciones de la presente descripción, la concentración de un conjugado HRS-Fc (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) es aproximadamente el 0,01 %, aproximadamente el 0,02 %, aproximadamente el 0,03 %, aproximadamente el 0,05 %, aproximadamente el 0,07 %, aproximadamente el 0,1 %, aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,6 %, aproximadamente el 0,8 % o aproximadamente el 1 % (p/v).

- 20 En ciertas realizaciones de la presente descripción, donde el vehículo incluye agua, también se puede incluir un agente que aumenta la viscosidad en la formulación. El experto en la materia estará familiarizado con los agentes que aumentan la viscosidad que son adecuados (por ejemplo, derivados de celulosa solubles en agua (por ejemplo, hipromelosa (también conocida como HPMC, hidroxipropilmetilcelulosa e hidroxipropilcelulosa), hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, etc.), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, sulfato de condroitina, ácido hialurónico y almidones solubles. Se pretende que, cuando se usan agentes que aumentan la viscosidad, no se incluyan en concentraciones suficientemente altas, de modo que la formulación formara un gel antes o después de la administración (por ejemplo, donde la concentración del agente que aumenta la viscosidad no es suficiente para inducir la formación de gel).

- 30 Aunque las concentraciones exactas de los agentes que aumentan la viscosidad dependerán de la selección y concentración de otros componentes en la formulación, así como del agente o agentes de que aumentan la viscosidad seleccionados, en general, los agentes que aumentan la viscosidad pueden estar presentes en una concentración tal que la viscosidad de la solución resultante es menor de aproximadamente 1000 centipoises. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la viscosidad de la formulación es menor de aproximadamente 900, menor de aproximadamente 800, menor de aproximadamente 700, menor de aproximadamente 600, menor de aproximadamente 500, menor de aproximadamente 400, menor de aproximadamente 300, menor de aproximadamente 200, menor de aproximadamente 150, menor de aproximadamente 100, menor de aproximadamente 50 centipoises. En algunas realizaciones de la presente descripción, la viscosidad de la formulación es aproximadamente 200, aproximadamente 150, aproximadamente 100, aproximadamente 50 centipoises. En realizaciones particulares de la presente descripción, la viscosidad es menor de aproximadamente 200 centipoises. En otras, menor de aproximadamente 120 centipoises o menor de aproximadamente 100 centipoises. En algunas realizaciones de la presente descripción, la viscosidad es de aproximadamente 100 centipoises. En otras aproximadamente 50 centipoises. En aún otras realizaciones de la presente descripción, la viscosidad es de aproximadamente 200 centipoises. Los procedimientos para medir la viscosidad son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, como se describe en la Farmacopea de los Estados Unidos 29 (Capítulo 911) Viscosidad, página 2785. Como es bien sabido por los expertos en la materia, las formulaciones comúnmente consideradas «geles» tendrán una viscosidad significativamente mayor de 1000 centipoises, por ejemplo, mayor de aproximadamente 2000 centipoises, mayor de aproximadamente 5000 centipoises.

- 50 En algunas realizaciones de la presente descripción, incluyendo (aunque sin limitarse a) que el uso de sales está contraindicado como se ha descrito anteriormente, la formulación puede incluir además uno o más agentes de tonicidad. Como se usa en el presente documento, la expresión «agente de tonicidad» y sus análogos se refieren a agentes que ajustan la tonicidad de la formulación, pero no son sales (por ejemplo, no NaCl), que, como apreciará el experto en la materia a la vista de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, están contraindicados para algunas formulaciones debido a la presencia de ciertos polímeros formadores de gel o agentes que aumentan la viscosidad. Estos agentes pueden usarse para preparar formulaciones que son isotónicas o casi isotónicas (por ejemplo, algo hiper- o hipoisotónicas, por ejemplo, dentro de aproximadamente ± 20 %, aproximadamente ± 15 %, aproximadamente ± 10 %, aproximadamente ± 5 % de ser isotónicos). El o los agentes de tonicidad también se pueden usar en formulaciones donde el uso de sales no está contraindicado.

Los agentes de tonicidad que se pueden usar para ajustar la tonicidad de la formulación de las formulaciones descritas en el presente documento y que son conocidos por los expertos en la materia y pueden seleccionarse basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, los agentes de tonicidad

5 incluyen polioles (por ejemplo, alcoholes de azúcar (por ejemplo, manitol, etc.), alcoholes de trihidroxi (por ejemplo, glicerina, etc.), propilenglicol o polietilenglicol, etc.), o combinaciones de dos o más polioles. Del mismo modo, la concentración del o de los agentes de tonicidad dependerá de la identidad y las concentraciones de los otros componentes en la formulación y puede ser determinada fácilmente por el experto en la materia en vista de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

10

En ciertas realizaciones de la presente descripción, el agente de tonicidad es glicerina o manitol. En algunas realizaciones de la presente descripción, el agente de tonicidad es glicerina. En otras realizaciones de la presente descripción, es manitol. En todavía otras se puede usar una combinación de manitol y glicerina. Las concentraciones ejemplares de agentes de tonicidad incluyen, por ejemplo, de aproximadamente el 0,001 a aproximadamente el 3 %.

15 En algunas realizaciones de la presente descripción, la concentración del agente de tonicidad (por ejemplo, manitol o glicerina) es, por ejemplo, de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 2,7 %, de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 2,5 %, de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 2 %, de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 1,5 %, de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 1 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 3 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 2,7 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 2,5 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 2 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 1,5 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 1 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 3 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 2,7 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 2,5 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 2 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1,5 %, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1 %, de aproximadamente el 0,01 % de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 3 %; de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2,5 %; de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 %; de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 1,8 %; de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 1,5 %; o aproximadamente el 0,001 %, aproximadamente el 0,01 %, aproximadamente el 0,05 %, aproximadamente el 0,08 %, aproximadamente el 0,1 %, aproximadamente el 0,2 %, aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,8 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 1,8 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 2,2 %, aproximadamente el 2,5 %, aproximadamente el 2,8 % o aproximadamente el 3 % (p/v). En ciertas realizaciones de la presente descripción, el agente de tonicidad es manitol. En algunas de estas realizaciones de la presente descripción, el portador incluye un agente formador de gel (por ejemplo, goma gellan).

35

En algunas realizaciones de la presente descripción, el agente de tonicidad es manitol. En ciertas de estas realizaciones de la presente descripción, el portador incluye un agente que aumenta la viscosidad (por ejemplo, derivados de celulosa solubles en agua (por ejemplo, hipromelosa), alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, sulfato de condroitina, ácido hialurónico o almidones solubles).

40

En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación puede incluir adicionalmente un conservante (por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorhexidina, clorobutanol, metilparabeno, alcohol feniletílico, propilparabeno, timerosal, nitrato fenilmercúrico, borato fenilmercúrico, o acetato fenilmercúrico, peróxidos), o una combinación de dos o más de los conservantes anteriores. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el

45

conservante es cloruro de benzalconio.

Como apreciará el experto en la materia, los conservantes pueden estar presentes en concentraciones de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,7 % (p/v). En realizaciones particulares de la presente descripción, el o los conservantes pueden estar presentes en una concentración de aproximadamente el 0,001 % a

50 aproximadamente el 0,5 % (p/v); de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,05 % (p/v), de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,02 % (p/v), de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,015 % (p/v), de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,005 % (p/v), de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,02 %, de aproximadamente el 0,002 % a aproximadamente el 0,01 %, de aproximadamente el 0,015 % a aproximadamente el 0,05 %, menos de aproximadamente <0,5 %, de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 0,01 %, de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,15 %, de aproximadamente el 0,002 % a aproximadamente el 0,004 %, de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,002 %. En algunas realizaciones de la presente descripción, la concentración del conservante puede ser, por ejemplo, aproximadamente el 0,001 %, aproximadamente el 0,005 %, aproximadamente el 0,01 %, aproximadamente el 0,02 %, aproximadamente el 0,03 %, aproximadamente el 0,05 %, aproximadamente el 0,1 %, aproximadamente el 0,2 %, aproximadamente el 0,5 %, o aproximadamente el 0,7 % (p/v). Las concentraciones

60

típicas (p/v) para diversos conservantes de uso común se enumeran en la **tabla C** a continuación.

TABLA C	
Conservante	Intervalo de concentración aproximado (p/v)
Cloruro de benzalconio	0,01-0,02 %
Cloruro de bencetonio	0,01-0,02 %
Clorhexidina	0,002-0,01 %
Clorobutanol	<0,5 %
Metilparabeno	0,015-0,05 %
Alcohol feniletílico	<0,5 %
Propilparabeno	0,005-0,01 %
Timerosal	0,001-0,15 %
Nitrato fenilmercúrico	0,002-0,004 %
Borato fenilmercúrico	0,002-0,004
Acetato fenilmercúrico	0,001-0,002

En ciertas realizaciones de la presente descripción, la formulación puede incluir adicionalmente un tensioactivo, o combinaciones de dos o más tensioactivos. En realizaciones particulares de la presente descripción, la formulación está sustancialmente libre de tensioactivo. Tal como se usa en el presente documento, el término «sustancialmente libre» pretende referirse a niveles de un componente particular que no son detectables usando procedimientos y protocolos de detección de rutina conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, HPLC (incluyendo HPLC quiral, HPLC quiral/MS, LC/MS/MS, etc.), cromatografía en capa fina, espectrometría de masas, mediciones polarimétricas, cromatografía de gases-espectrometría de masas, u otros.

En realizaciones particulares de la presente descripción, la formulación puede incluir además un agente quelante (por ejemplo, EDTA disódico (EDTA) (por ejemplo, EDTA disódico (dihidrato), etc.) citratos, etc.). En algunas realizaciones de la presente descripción, puede estar presente una combinación de agentes quelantes. Como apreciarán los expertos en la materia, los agentes quelantes se pueden usar para impedir la degradación de los componentes de la formulación y, por lo tanto, aumentar la vida útil de las formulaciones. Como apreciará el experto en la materia, el uso de EDTA en combinación con una formulación de goma gellan puede estar contraindicado, ya que el EDTA puede causar la formación de gel antes de la administración de la formulación de goma gellan.

Las concentraciones típicas para los agentes quelantes son de aproximadamente el 0,005 % al 0,1 % (p/v). Por ejemplo, de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 0,09 %, de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 0,08 %, de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 0,07 %, de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 0,06 %, de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 0,05 %, de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 0,04 %, de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 0,03 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,1 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,09 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,08 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,07 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,06 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,05 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,04 %, etc. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la concentración de uno o más agentes quelantes es aproximadamente el 0,005 %, aproximadamente el 0,01 %, aproximadamente el 0,02 %, aproximadamente el 0,03 %, aproximadamente el 0,05 %, aproximadamente el 0,06 %, aproximadamente el 0,07 %, aproximadamente el 0,08 %, aproximadamente el 0,09 % o aproximadamente el 0,1 %.

En realizaciones particulares de la presente descripción, el agente quelante es EDTA disódico. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el agente quelante es EDTA disódico (dihidrato). En algunas de estas realizaciones de la presente descripción, el EDTA disódico dihidrato está presente a una concentración de aproximadamente el 0,01 % (p/v).

En algunas realizaciones de la presente descripción, la formulación puede incluir adicionalmente uno o más agentes tamponantes (por ejemplo, uno o más tampones de fosfato (por ejemplo, tampones de fosfato de sodio (por ejemplo, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, etc.), tampones de citrato, tampones de maleato, tampones de borato, etc.) Como apreciará el experto en la materia, el uno o más agentes tamponantes, deben seleccionarse en combinación con los otros componentes de una formulación dada para conseguir un pH adecuado para su uso (por ejemplo, pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8).

En ciertas realizaciones de la presente descripción, el agente tamponante es un tampón fosfato o una combinación

de dos o más tampones fosfato. En ciertas realizaciones de la presente descripción, los agentes tamponantes son fosfato sódico dibásico y fosfato sódico monobásico.

Las concentraciones típicas para el agente o agentes tamponantes, por ejemplo, el agente o agentes tamponantes de fosfato pueden ser de aproximadamente 0,005 molar a 0,1 molar. En algunas realizaciones de la presente descripción, el agente o agentes tamponantes pueden estar a una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,08, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,04, de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,1, de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,08, de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,06, de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,05, de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,04 molar, etc. En realizaciones particulares de la presente descripción, hay dos agentes tamponantes. Los agentes tamponantes ejemplares incluyen una combinación de fosfato de sodio dibásico (por ejemplo, fosfato de sodio dibásico, $7H_2O$) y fosfato de sodio monobásico (por ejemplo, fosfato de sodio monobásico anhidro). En algunas realizaciones de la presente descripción, la concentración del o de los agentes tamponantes es aproximadamente 0,005 molar, aproximadamente 0,01 molar, aproximadamente 0,02 molar, aproximadamente 0,03 molar, aproximadamente 0,04 molar, aproximadamente 0,05 molar, aproximadamente 0,06 molar, aproximadamente 0,07 molar, o aproximadamente 0,1 molar.

Un aspecto adicional de la presente descripción incluye el uso de las formulaciones como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento. Particularmente, la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento y/o la prevención de afecciones como se describe en el presente documento. Además, las formulaciones, que se describen de manera diversa en el presente documento, también están destinadas para uso en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento y/o la prevención de las afecciones y, de acuerdo con los procedimientos, descritos en el presente documento, a menos que se indique lo contrario.

Los procedimientos de formulación son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19ª Edición (1995). Las composiciones y agentes proporcionados en el presente documento pueden administrarse de acuerdo con los procedimientos de la presente descripción en cualquier régimen de dosificación terapéuticamente efectivo. La cantidad y la frecuencia de dosificación se seleccionan para crear un nivel efectivo del agente sin efectos perjudiciales. La cantidad efectiva de un compuesto de la presente descripción dependerá de la vía de administración, el tipo de animal de sangre caliente que esté siendo tratado y las características físicas del animal específico de sangre caliente en consideración. Estos factores y su relación con la determinación de esta cantidad son bien conocidos por los expertos en medicina. Esta cantidad y el procedimiento de administración pueden adaptarse para conseguir una eficacia óptima, pero dependerán de factores tales como el peso, la dieta, la medicación concurrente y otros factores que reconocerán los expertos en medicina.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante pulverizaciones intranasales, inhalación y/u otros vehículos de administración en aerosol. Los procedimientos para administrar genes, polinucleótidos y composiciones peptídicas directamente a los pulmones a través de pulverizaciones nasales en aerosol se han descrito, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 5.756.353 y la patente de Estados Unidos N.º 5.804.212. Del mismo modo, la administración de fármacos que utilizan resinas de micropartículas intranasales (Takenaga y col., 1998) y compuestos de lisofosfatidilglicerol (patente de Estados Unidos N.º 5.725.871) también son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. Del mismo modo, la administración de un fármaco transmucoso en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente de Estados Unidos N.º 5.780.045.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, la administración puede producirse mediante el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, para la introducción de las composiciones de la presente descripción en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones de la presente descripción pueden formularse para la administración encapsulada en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similares. La formulación y el uso de dichos vehículos de administración pueden llevarse a cabo usando técnicas conocidas y convencionales.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, los agentes proporcionados en el presente documento pueden unirse a un sustrato sólido farmacéuticamente aceptable, que incluye sustratos biocompatibles y biodegradables tales como polímeros y matrices. Los ejemplos de dichos sustratos sólidos incluyen, sin limitación, poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de Estados Unidos N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-glicólico degradables tales como poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y

LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico, colágeno, metal, hidroxiapatita, Bioglass, aluminato, materiales biocerámicos y proteínas purificadas.

- 5 En una realización particular de la presente descripción, el sustrato sólido comprende Atrigel™ (QLT, Inc., Vancouver, B.C.). El sistema de administración de fármacos Atrigel® consiste en polímeros biodegradables disueltos en portadores biocompatibles. Los productos farmacéuticos pueden mezclarse en este sistema de administración de líquidos en el momento de la fabricación o, dependiendo del producto, el médico puede añadirlos más tarde en el momento de su uso. Cuando el producto líquido se inyecta en el espacio subcutáneo a través de una aguja de pequeño calibre o se coloca en sitios de tejido accesibles a través de una cánula, el agua en los fluidos tisulares hace que el polímero precipite y atrape el fármaco en un implante sólido. El fármaco encapsulado dentro del implante se libera a continuación de forma controlada a medida que la matriz polimérica se biodegrada con el tiempo.
- 10
- 15 En realizaciones particulares de la presente descripción, la cantidad de una composición de conjugado HRS-Fc administrada variará generalmente de una dosis de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg, y típicamente de aproximadamente 0,1 a 10 o 20 mg/kg cuando se administra por vía oral, por vía subcutánea o por vía intravenosa. En realizaciones particulares de la presente descripción, una dosis es aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 7,5 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg.
- 20 En ciertas realizaciones de la presente descripción, una composición se administra en una dosis única de 0,1 a 10 mg/kg o de 0,5 a 5 mg/kg. En algunas realizaciones de la presente descripción, una composición se administra en una dosis de 0,1 a 50 mg/kg, 0,5 a 20 mg/kg, o 5 a 20 mg/kg.

Para seres humanos, la dosis diaria usada puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a 5 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg a 10 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a 20 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg a 30 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg a 50 mg/kg, y aproximadamente 50 mg/kg a 100 mg/kg/24 horas.

Para conjugados HRS-Fc con semividas más largas, la dosificación humana usada puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/kg/semana a 0,5 mg/kg/semana, aproximadamente 1 mg/kg/semana a 5 mg/kg/semana, aproximadamente 5 mg/kg/semana a 10 mg/kg/semana, aproximadamente 10 mg/kg/semana a 20 mg/kg/semana, aproximadamente 20 mg/kg/semana a 30 mg/kg/semana, aproximadamente 30 mg/kg/semana a 50 mg/kg/semana, o aproximadamente 50 mg/kg/semana a 100 mg/kg/semana.

35 Los conjugados HRS-Fc con semividas aún más largas se pueden dosificar en seres humanos de aproximadamente 0,1 mg/kg/mes a 0,5 mg/kg/mes, aproximadamente 1 mg/kg/mes a 5 mg/kg/mes, aproximadamente 5 mg/kg/mes a 10 mg/kg/mes, aproximadamente 10 mg/kg/mes a 20 mg/kg/mes, aproximadamente 20 mg/kg/mes a 30 mg/kg/mes, aproximadamente 30 mg/kg/mes a 50 mg/kg/mes, o aproximadamente 50 mg/kg/mes a 100 mg/kg/mes.

40 En diversas realizaciones de la presente descripción, la dosificación es de aproximadamente 50-2500 mg por día, 100-2500 mg/día, 300-1800 mg/día, o 500-1800 mg/día, o 500-2500 mg por semana, 1000 -2500 mg/semana, 300-1800 mg/semana, o 500-1800 mg/semana, o 500-2500 mg por mes, 1000-2500 mg/mes, 300-1800 mg/mes, o 500-1800 mg/mes. En algunas realizaciones de la presente descripción, la dosis está entre aproximadamente 100 y 600 mg/día, 100 y 600 mg/semana, o 100 y 600 mg/mes. En algunas realizaciones de la presente descripción, la dosis está entre aproximadamente 300 y 1200 mg/día, 300 y 1200 mg/semana, o 300 y 1200 mg/mes. En realizaciones particulares de la presente descripción, la composición o el agente se administra en una dosificación de 100 mg/semana, 2,4 mg/semana 300 mg/semana, 600 mg/semana, 1000 mg/semana, 1200 mg/semana o 1800 mg/semana, en una o más dosis por semana o por mes (es decir, cuando las dosis combinadas consiguen la dosis semanal o mensual deseada). En algunas realizaciones de la presente descripción, una dosis es 100 mg dos veces al día, 150 mg dos veces al día, 240 mg dos veces al día, 300 mg dos veces al día, 500 mg dos veces al día o 600 mg dos veces al día. En diversas realizaciones de la presente descripción, la composición o el agente se administra en dosis únicas o repetidas. La dosificación inicial y las dosificaciones posteriores pueden ser iguales o diferentes.

55 En algunas realizaciones de la presente descripción, la dosis diaria total puede ser aproximadamente 0,001 mg, aproximadamente 0,005 mg, aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg,

aproximadamente 90 mg o aproximadamente 100 mg/24 horas.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la dosis semanal total puede ser de aproximadamente 0,001 mg, aproximadamente 0,005 mg, aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 90 mg o aproximadamente 100 mg/ semana.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la dosis mensual total puede ser de aproximadamente 0,001 mg, aproximadamente 0,005 mg, aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 90 mg o aproximadamente 100 mg/mes.

Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de estas y otras terapias (por ejemplo, terapias *ex vivo*) puede monitorizarse fácilmente mediante procedimientos y ensayos convencionales y basándose en criterios conocidos por el médico u otras personas expertas en la materia.

Se apreciará además que, para dispositivos y composiciones de administración sostenida, la dosis total de HRS contenida en dicho sistema de administración será correspondientemente mayor dependiendo del perfil de liberación del sistema de liberación sostenida. Por lo tanto, una composición o dispositivo de liberación sostenida que está concebido para administrar conjugados HRS-Fc durante un período de 5 días típicamente comprenderá al menos aproximadamente de 5 a 10 veces la dosis diaria de conjugado HRS-Fc; una composición o dispositivo de liberación sostenida que está concebido para administrar un conjugado HRS-Fc durante un período de 365 días típicamente comprenderá al menos aproximadamente de 400 a 800 veces la dosis diaria del conjugado HRS-Fc (dependiendo de la estabilidad y la biodisponibilidad del conjugado HRS-Fc cuando se administra usando el sistema de liberación sostenida).

En ciertas realizaciones de la presente descripción, una composición o agente se administra por vía intravenosa, por ejemplo, por infusión durante un período de tiempo de aproximadamente, por ejemplo, 10 minutos a 90 minutos. En otras realizaciones relacionadas de la presente descripción, una composición o agente se administra mediante infusión continua, por ejemplo, a una dosis de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 mg/kg/h durante un período de tiempo. Aunque el período de tiempo puede variar, en ciertas realizaciones de la presente descripción, el período de tiempo puede estar entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 24 horas o entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente tres días.

En realizaciones particulares de la presente descripción, una cantidad efectiva o una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad suficiente para mantener una concentración del conjugado HRS-Fc en el plasma sanguíneo de un sujeto por encima de aproximadamente 300 pM, por encima de aproximadamente 1 nM, por encima de aproximadamente 10 nM, por encima de aproximadamente 100 nM, o por encima de aproximadamente 1000 nM.

En ciertas realizaciones de la presente descripción, una dosificación IV o SC es una cantidad suficiente para alcanzar una concentración en plasma sanguíneo (C_{max}) de entre aproximadamente 1.000 nM y aproximadamente 5.000 nM o entre aproximadamente 200 nM y aproximadamente 1.000 nM, o aproximadamente 20 nM y aproximadamente 200 nM.

En realizaciones particulares de la presente descripción, un conjugado HRS-Fc se administra en una cantidad y frecuencia suficientes para conseguir en el mamífero una concentración en plasma sanguíneo que tenga una concentración mínima media de entre aproximadamente 300 pM y aproximadamente 1 nM y/o una concentración en situación de equilibrio de entre aproximadamente 300 pM y aproximadamente 1 nM. En algunas realizaciones de la presente descripción, la C_{min} del conjugado HRS-Fc en el plasma sanguíneo del mamífero se mantiene por encima de aproximadamente 1 nM y/o una concentración en situación de equilibrio de entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 10 nM. En ciertas realizaciones de la presente descripción, la C_{min} del conjugado HRS-Fc en el plasma sanguíneo del mamífero se mantiene por encima de aproximadamente 10 nM y/o una concentración en situación de equilibrio de entre aproximadamente 10 nM y aproximadamente 100 nM. En ciertas realizaciones de la

presente descripción, la $C_{\min}$ del conjugado HRS-Fc en el plasma sanguíneo del mamífero se mantiene por encima de aproximadamente 100 nM y/o una concentración en situación de equilibrio de entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1000 nM.

- 5 En realizaciones particulares de la presente descripción, una cantidad efectiva del conjugado HRS-Fc, o la concentración en plasma sanguíneo del conjugado HRS-Fc, se alcanza o mantiene, con una administración única, por ejemplo, durante al menos 15 minutos, al menos 30 minutos, al menos 45 minutos, al menos 60 minutos, al menos 90 minutos, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 10 una semana, al menos 2 semanas, al menos un mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, o al menos 6 meses.

- 15 En realizaciones particulares de la presente descripción, la dosificación eficaz alcanza los niveles en plasma sanguíneo o la concentración mínima media de una composición o agente descrito en el presente documento. Estos pueden determinarse fácilmente usando procedimientos de rutina.

- 20 Las realizaciones de la presente descripción, en otros aspectos de la presente descripción, proporcionan kits que comprenden uno o más recipientes llenos con uno o más de los conjugados HRS-Fc, polipéptidos, polinucleótidos, anticuerpos, complejos de múltiples unidades, composiciones de los mismos, etc., de la presente descripción, como se describe en el presente documento. Los kits pueden incluir instrucciones escritas sobre cómo usar dichas composiciones (por ejemplo, para modular la señalización celular, la angiogénesis, el cáncer, las afecciones inflamatorias, el diagnóstico, etc.).

- 25 Los kits en el presente documento también pueden incluir uno o más agentes terapéuticos adicionales u otros componentes adecuados o deseados para la indicación que está siendo tratada, o para la aplicación de diagnóstico deseada. Un agente terapéutico adicional puede estar contenido en un segundo recipiente, si se desea. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales incluyen, aunque sin limitarse a, agentes antineoplásicos, agentes antiinflamatorios, agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes angiogénicos, etc.

- 30 Los kits en el presente documento también pueden incluir una o más jeringas u otros componentes necesarios o deseados para facilitar un modo de administración previsto (por ejemplo, endoprótesis vasculares, depósitos implantables, etc.).

- 35 Ciertas realizaciones de la presente descripción se ilustrarán a continuación mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos que no están dentro del alcance de las reivindicaciones no forman parte de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

- 40 **PRODUCCIÓN DE SU RESOKINE ETIQUETADA CON HIS (HRS QUE COMPRENDE LOS AMINOÁCIDOS 1-60)**

- Optimización de codones y síntesis génica.** El ADN que codifica Resokine (HRS (1-60)) se sometió a optimización de codones para la expresión de *E. coli* usando el algoritmo desarrollado por DNA2.0 (Menlo Park, CA).

- 45 La secuencia de ADN con optimización de codones es la siguiente:
 ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAACTGCAAGGTGAACGTGTTTCGTGG
 TCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGATCGAAGAAGAGGTGGCCAAACTGCTG
 AAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCCGACGAGAGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCC
 GAAACACCACCATCACCATCAC (SEQ ID NO:261)
 La secuencia de proteína traducida es la siguiente:
 MAERAALVELVQLQGERVRGLKQQKASAEIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKH
 HHHHH (SEQ ID NO:262)

- 50 Adicionalmente, se prepararon versiones modificadas por ingeniería de esta construcción con residuos de cisteína insertados cerca del extremo N (que comprende residuos adicionales de Met y Cys en el extremo N), el extremo C (que comprende una cisteína C-terminal adicional en la posición 61) y en el dominio enlazador que une las 2 secciones alfa helicoidales de la molécula (que comprende la mutación Ala 26→Cys). Las secuencias de ADN con

optimización de codones y las secuencias de aminoácidos correspondientes para estas construcciones se enumeran a continuación.

H-N4:1-H (codón-HRS(1-60)-M1MC-6xHis):

ATGTGTGCAGAAAGAGCCGCCCTGGAAGAGTTAGTTAAGTTGCAAGGTGAACGTGTCCG
TGGTCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGATCGAAGAAGAGGTGGCCAAACTG
CTGAAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCCGACGAGAGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAAC

5 CCCGAAACACCACCATCACCATCAC (SEQ ID NO:263)

La secuencia de proteína traducida es la siguiente:

MCAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPK

HHHHHH (SEQ ID NO:264)

H-N4:2-H (codón-HRS(1-60)-A26C-6xHis):

ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAACTGCAAGGTGAACGTGTTTCGTGG
TCTGAAGCAGCAGAAGTGCAGCGCGGAGCTGATCGAAGAAGAGGTGGCCAAACTGCTG
AAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCCGACGAGAGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCC

GAAACACCACCATCACCATCAC (SEQ ID NO:265)

10 La secuencia de proteína traducida es la siguiente:

MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKCSAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKH

HHHHH (SEQ ID NO:266)

H-N4:3-H (codón-HRS(1-60)-C61-6xHis):

ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAACTGCAAGGTGAACGTGTTTCGTGG
TCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGATCGAAGAAGAGGTGGCCAAACTGCTG
AAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCCGACGAGAGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCC

GAAATGCCACCACCATCACCATCAC (SEQ ID NO:267)

La secuencia de proteína traducida es la siguiente:

MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKC

15 HHHHHH (SEQ ID NO:268)

Los genes correspondientes se sintetizaron (ADN 2.0) con una etiqueta 6xHis C-terminal y se subclonaron en el vector de expresión pJexpress411 donde se usó el promotor T7 para impulsar la transcripción y se usó resistencia a kanamicina para la selección de antibióticos.

- 20 **Cepa de expresión.** Las células competentes BL21(DE3) (Novagen, n.º de cat. 69450) se transformaron con la construcción de expresión con optimización de codones relevante, tal como se describe. En resumen, el plásmido (1 µl) se añadió a 50 µl de las células competentes. La reacción se mezcló y se incubó en hielo durante 30 minutos. La reacción se sometió a un choque de calor a 42 °C durante 30 segundos, seguido de un choque de frío sobre hielo durante 2 minutos. A continuación se añadió el medio SOC (500 µl) y el tubo se incubó a 37 °C, 250 rpm durante 1 hora. Finalmente, se extendió una parte alícuota del cultivo (50 µl) sobre la placa de kanamicina (Teknova S9641) y se incubó a 37 °C durante una noche. Se seleccionó una sola colonia y se usó para el aumento de escala de la expresión.

- 30 **Medio.** El medio M9YE se preparó mezclando 200 ml de sal mínima M9 estéril 5X (BD248510), 778 ml de 30 g/l de extracto de levadura en agua purificada estéril (BD212750), 20 ml de glucosa esterilizada al 20 % (Sigma G7021) y 2 ml de MgSO₄ 1,0 M estéril (Sigma M7506). La solución de alimentación contiene 5 % de extracto de levadura, 50 % de glucosa, oligoelementos y 2 g/l de sulfato de magnesio. Se añadió sulfato de kanamicina (Invitrogen 15160) a una concentración final de 100 µg/ml tanto en M9YE como en la solución de alimentación.

- 35 **Fermentación por lotes alimentados.** Se usó un fermentador de 4 l (Sartorius Biostat B plus) con el software MFCS/DA para la fermentación por lotes alimentados. La agitación se ajustó a 1000 rpm. El valor del pH se controló automáticamente a 7,0 mediante la adición de un 30 % de hidróxido de amonio (Sigma 221228) y un 30 % de ácido fosfórico (Sigma P5811). El aire se proporcionó a un caudal de 4 l/min con un compresor de aire de diafragma sin

aceite (Cole-Parmer). El aire se hizo pasar a través de un filtro Midisart 2000 de 0,2 μm (Sartorius 17805). El oxígeno puro (West Air) se suministró automáticamente para controlar el nivel de oxígeno disuelto al 70 %. La temperatura se controló a 30 °C con un circulador Neslab RTE7 (Thermo Scientific). La formación de espuma se controló mediante la adición del antiespumante 204 (Sigma A8311). El volumen inicial de medio M9YE en el fermentador fue 3 l. El fermentador se inoculó con 150 ml del cultivo de siembra que se hizo crecer durante una noche a 30 °C y 250 rpm. Cuando la glucosa se agotó en el recipiente, la solución de alimentación concentrada se introdujo en el recipiente mediante una bomba peristáltica ajustada a 0,9 ml/min. Cuando la densidad óptica de las células a 600 nm alcanzó aproximadamente 30, se indujo el cultivo con IPTG 0,5 mM (Fisher Scientific BP1755). El cultivo se realizó durante una noche (aproximadamente 18 horas en fase de lote alimentado) y se recogió mediante centrifugación a 6.000 x g durante 1 hora. El sedimento celular se almacenó a -20 °C hasta la purificación. La expresión de Resokine se confirmó en SDS-PAGE.

Purificación de proteínas. Resokine y las variantes de Cys de la misma se purificaron a partir de pasta celular de *E. coli* a través de lisis celular y clarificación; cromatografía por afinidad metálica inmovilizada y cromatografía de intercambio catiónico. Las células congeladas que pesaban 10 g y que contenían Resokine o variantes de Cys se descongelaron y se resuspendieron en tampón NiNTA 1X (Tris 50 mM, NaCl 0,3 M, imidazol 25 mM, pH 8) en una proporción de pasta de 4:1 ml/g junto con beta-mercaptoetanol 5 mM (Sigma n.º de cat. M7154-25ML) y 1 comprimido de cóctel inhibidor de proteasa (Roche n.º de cat. 05 056 489 001). Después de que todas las células se resuspendieron, las células se lisaron en hielo en un Microfluidizador M-110Y, 2 pases a 15000 psi en hielo para liberar Resokine soluble o variantes de Cys. Se añadió tampón NiNTA después del segundo pase para limpiar el lisado restante a través del Microfluidizador (100-120 ml de volumen final después de la lisis). El lisado se centrifugó a 15000 x g a 4°C durante 30 min. El sobrenadante se filtró a 0,45/0,2 μm con un Acropak 200 (Pall n.º de cat. 12094). El sobrenadante filtrado es lisado clarificado.

Purificación por cromatografía por afinidad metálica inmovilizada (IMAC). El lisado clarificado de 10 g de pasta celular se cargó en una columna de flujo por gravedad que contenía 3 ml de resina NiNTA (Qiagen n.º 30210) y se equilibró previamente en tampón NiNTA. La resina se lavó con 50 volúmenes de columna (VC) de Triton X-114 al 0,1 % en 1X tampón NiNTA para eliminar la endotoxina, a continuación con 30 VC de 1X tampón NiNTA, seguido de elución con 5 VC de tampón de elución NiNTA (Tris 50 mM, NaCl 0,3 M, Imidazol 0,3 M pH 8 @ 4 °C).

Purificación por cromatografía de intercambio catiónico (CEX). La carga de CEX se preparó diluyendo el eluyente NiNTA 1/20x en el tampón CEX A (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, DTT 2 mM), a continuación se cargó en una columna de alto rendimiento SP Sepharose equilibrada en CEX A. La proteína se eluyó con un gradiente lineal del 0-100 % B sobre 20 VC, donde A = fosfato de sodio 10 mM pH 7,0, DTT 2 mM y B = fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 1 M, DTT 2 mM, pH 7,0, monitorizando la absorbancia a 214 nm. Las fracciones se agruparon correspondientes al pico principal en el gradiente de elución por absorbancia a 214 nm. El agrupamiento de CEX se intercambió con tampón en PBS 1X pH 7,4 (Gibco n.º 10010) usando dispositivos ultracentrífugos Amicon Ultra-15 3 kD MWCO.

40 EJEMPLO 2

PRODUCCIÓN DE HISTIDIL-ARNT SINTETASA DE LONGITUD COMPLETA (HRS) ETIQUETADA CON HIS

Optimización de codones y síntesis génica. El gen HisRS de longitud completa se sometió a optimización de codones para la expresión de *E. coli* y se subclonó en el vector pET21a, donde se usó el promotor T7 para impulsar la transcripción. Además, se unieron un enlazador de 5 aminoácidos y una etiqueta 6xHis al extremo C.

La secuencia de ADN es la siguiente:

ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGAACGCGTACGTGG
TCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGAAGAAGAAGTTGCCAAATTACTGA
AACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGATGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCC

AAAGGAACCCGTGATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTTCGACGTT
ATTATTTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGTATTTGAATTG
AAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAAACTGATTTATGATTTGAAAGA
CCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCGCTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTT
AGCCATGAATAAaTTaACCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGA
CAACCCTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGATATTGC
CGGAAATTTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTTTGAAAATTATGTGTGAAATTCT
GAGTTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGG
TATGTTTGCTATTTGCGGTGTTTCTGATTCCAAATTCCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGAC
AAATTGGATAAAGTGTCTTGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAGGCC
TGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAACATGGCGGTGTGTCCT
TAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGAGCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGA
CTGGGAGATCTGAAATTACTCTTTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATT
AGCTTTGATCTGAGCTTGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT
GTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTCGGCAGTGTGGC
AGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTTGACCCTAAAGGCCGTAAAGTACC
ATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTGCAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAA
GCTTTGGAGGAAAAGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAA
AAACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGGCATCAAGGC
CGAACTGCTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCAACTCCAGTATTGTGAAGAAG
CTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGGTGAGCAAGAATTAAGATGGCGTGATTAAAC
TGCGTTTCAGTAACAAGCCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAA
ATTAAACGCCGCACCGGTCAACCGTTATGTATTTGCGCGGCCGCACTCGAGCACCACCAC
CACCACCACTGA (SEQ ID NO:269)

La secuencia de la proteína traducida es la siguiente:

MAERAALVELVKLQGERVRGLKQKASAEIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKG
TRDYSRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGG
LLSLRYDLTVPFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDP
MIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE
VKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQHHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEY
LTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMF
DPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLVASAQKKLEERLKLVSSELWD
AGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVKLRSVTSREEVDVRREDLVE
EIKRRTGQPLCICAAALEHHHHHH (SEQ ID NO:270)

Cepa de expresión. Las células competentes BL21(DE3) (Novagen, n.º de cat. 69450) se transformaron con la construcción de expresión con optimización de codones. En resumen, el plásmido (1 µl) se añadió a 50 µl de las células competentes. La reacción se mezcló y se incubó en hielo durante 30 minutos. La reacción se sometió a un

choque de calor a 42 °C durante 30 segundos, seguido de un choque de frío sobre hielo durante 2 minutos. A continuación se añadió el medio SOC (500 µl) y el tubo se incubó a 37 °C, 250 rpm durante 1 hora. Finalmente, se extendió una parte alícuota del cultivo (50 µl) sobre la placa de ampicilina (Teknova S9641) y se incubó a 37 °C durante una noche. Se seleccionó una sola colonia y se usó para el aumento de escala de la expresión.

5

Medio. El medio M9YE se preparó mezclando 200 ml de sal mínima M9 estéril 5X (BD248510), 778 ml de 30 g/l de extracto de levadura en agua purificada estéril (BD212750), 20 ml de glucosa esterilizada al 20 % (Sigma G7021) y 2 ml de MgSO₄ 1,0 M estéril (Sigma M7506). La solución de alimentación contiene 5 % de extracto de levadura, 50 % de glucosa, oligoelementos y 2 g/l de sulfato de magnesio. Se añadió ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml tanto en M9YE como en la solución de alimentación.

10

Fermentación por lotes alimentados. Se usó un fermentador de 4 l (Sartorius Biostat B plus) con el software MFCS/DA para la fermentación por lotes alimentados. La agitación se ajustó a 1000 rpm. El valor del pH se controló automáticamente a 7,0 mediante la adición de un 30 % de hidróxido de amonio (Sigma 221228) y un 30 % de ácido fosfórico (Sigma P5811). El aire se proporcionó a un caudal de 4 l/min con un compresor de aire de diafragma sin aceite (Cole-Parmer). El aire se hizo pasar a través de un filtro Midisart 2000 de 0,2 µm (Sartorius 17805). El oxígeno puro (West Air) se suministró automáticamente para controlar el nivel de oxígeno disuelto al 70 %. La temperatura se controló a 30 °C con un circulador Neslab RTE7 (Thermo Scientific). La formación de espuma se controló mediante la adición del antiespumante 204 (Sigma A8311). El volumen inicial de medio M9YE en el fermentador fue 3 l. El fermentador se inoculó con 150 ml del cultivo de siembra que se hizo crecer durante una noche a 30 °C y 250 rpm. Cuando la glucosa se agotó en el recipiente, la solución de alimentación concentrada se introdujo en el recipiente mediante una bomba peristáltica ajustada a 0,9 ml/min. Cuando la densidad óptica de las células a 600 nm alcanzó aproximadamente 30, se indujo el cultivo con IPTG 0,5 mM (Fisher Scientific BP1755). El cultivo se realizó durante una noche (aproximadamente 18 horas en fase de lote alimentado) y se recogió mediante centrifugación a 6.000 x g durante 1 hora. El sedimento celular se almacenó a -20 °C hasta la purificación. La expresión de HisRS se confirmó en SDS-PAGE.

15

20

25

Purificación de HisRS. La pasta celular congelada (40 g) se resuspendió en 160 ml (es decir, 4 ml/g de pasta celular) de tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 400 mM, imidazol 20 mM, β-ME 14 mM, pH 8,0 a 4 °C). Se añadieron a la suspensión comprimidos completos de inhibidor de proteasa libre de EDTA (Roche) en una proporción de 1 comprimido/50 ml. La suspensión se hizo pasar a través de un microfluidizador (Microfluidics) dos veces a 15.000 psi con enfriamiento con hielo. El lisado se centrifugó a 35.000 x g durante 45 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de filtros de cápsula Acropak 200 de 0,22 µm (Pall).

30

El lisado clarificado se unió a la resina Ni-NTA (Qiagen), se equilibró previamente con tampón de unión Ni-NTA (Tris 20 mM, NaCl 400 mM, imidazol 20 mM, β-ME 5 mM, pH 8,0 a 4 °C). La columna se lavó con 500 volúmenes de columna de tampón de unión Ni-NTA + Triton X-114 al 0,1 %, seguido de 50 volúmenes de columna del tampón de unión Ni-NTA. La proteína unida, HisRS, se eluyó con 5 volúmenes de columna de tampón de elución Ni-NTA (Tris 20 mM, NaCl 400 mM, Imidazol 500 mM, β-ME 5 mM, pH 8,0 a 4 °C).

35

40

El eluato de Ni-NTA se purificó adicionalmente mediante una columna de intercambio aniónico. Específicamente, el eluato de Ni-NTA se dializó contra el tampón de unión Q (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, pH 7,4) y se cargó en una columna de Q-Sepharose de 5 ml, previamente equilibrada con el tampón de unión Q. El producto deseado se eluyó de la columna con un gradiente lineal de NaCl 0-1 M en el tampón de unión Q en 10 volúmenes de columna. La HisRS purificada se concentró y el tampón se intercambió en PBS (producto Invitrogen n.º 10010) + DTT 1 mM y se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm.

45

EJEMPLO 3

50 TITULACIÓN DE SITIOS ACTIVOS DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN HARS DE LONGITUD COMPLETA

Para determinar la ubicación e identidad de los residuos de cisteína expuestos en la superficie en HARS de longitud completa, se incubó proteína recombinante purificada con yodoacetamida en condiciones nativas y desnaturalizadas para alquilar cualquier residuo de cisteína expuesta en la superficie. Las muestras se analizaron a continuación limitando la proteólisis seguida por un análisis por LC-masa para determinar la ubicación y la identidad de los residuos de cisteína modificados.

55

Para realizar los estudios de alquilación, HARS etiquetada con polihistidina de longitud completa (6,65 mg/ml en PBS, glicerol al 10 %, DTT 2 mM, pH 7,4, (ejemplo 2) se redujo completamente por primera vez mediante incubación

con DTT 10 mM durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las incubaciones con yodoacetamida se llevaron a cabo con una concentración de yodoacetamida a 30 mM («Baja») o a 100 mM («Alta») durante 30 minutos en la oscuridad, y se llevaron a cabo en muestras nativas y desnaturalizadas de HARS para confirmar que la reacción fue exitosa. Se preparó HARS desnaturalizada mediante pre-incubación de la proteína con guanidina 4 M durante 45 minutos a 50 °C. Después de la incubación con yodoacetamida, las muestras se dializaron en PBS pH 7,4 a 4 °C usando una membrana de diálisis de valor de corte de peso molecular de 10 KDa, y con al menos 3 intercambios de tampón, y seguidamente se usó para el análisis por espectroscopia de masas como se describe a continuación.

En resumen, las muestras se prepararon diluyendo las proteínas en ácido fórmico al 0,1 % hasta una concentración final de 1 m/ml y se inyectaron y analizaron muestras de 5 µg de las proteínas mediante HPLC de fase inversa, seguido de un análisis del espectro de masas usando un espectrómetro de masas Agilent TOF. Las muestras se separaron primero en una columna de HPLC C3 (Agilent ZORBAX 300SB-C3, 5 µm, columna de 2,1x150 mm) usando un gradiente lineal de (fase móvil B al 2-60 %) durante 18 minutos (fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 %; fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo). El análisis por espectrometría de masas de las muestras se realizó en modo de perfil. Los datos fueron adquiridos y analizados por MassHunter (Agilent). El peso molecular medido fue calculado por MassHunter Bioconfirm (Agilent).

Los resultados (datos no mostrados) demostraron que, en condiciones nativas, solo se modifican fácilmente 3 o 4 residuos de cisteína, mientras que, en comparación, cuando la proteína se desnaturaliza por primera vez para romper su conformación nativa, las 10 cisteínas se desnaturalizaron fácilmente.

Para identificar la identidad de los residuos de cisteína modificados, las muestras antes y después de la incubación con yodoacetamida se sometieron a desnaturalización en Guanidina HCl 4 M a 37 °C durante 30 minutos, seguida de escisión proteolítica con LysC usando una proporción de 10:1 (p/p) a temperatura ambiente durante 20 h. Las digestiones de proteínas se analizaron por LC/MS/MS usando HPLC Dionex y el espectrómetro de masas Thermo LTQ XL. Las muestras se separaron primero en una columna de HPLC C18 (Agilent ZORBAX 300SB-C18, 5 µm, 2,1x150 mm) usando un gradiente de fase móvil B (fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 %; fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo). El gradiente comienza con 1-3 % de B en 10 minutos y a continuación 40 % de B en 76 minutos. Las digestiones de proteínas separadas se analizaron mediante MS completa en modo de perfil o mediante una exploración de MS completa, se analizaron mediante exploración de MS/MS en tándem en los tres iones superiores identificados. Los datos fueron adquiridos y analizados por Xcalibur (Thermo). La secuenciación de péptidos se basó en los espectros de MS/MS de cada péptido, donde los picos de iones b e y coinciden con sus iones teóricos. La identificación de los péptidos y el mapeo de los sitios de modificación se basan en el peso molecular y se confirman mediante secuenciación de péptidos usando espectros de MS/MS, y se enumeran en la **tabla E1**.

Tabla E1				
Resultados del mapeo de péptidos por LC-MS después de limitar la digestión con tripsina				
Residuo Cys	De - A	Secuencia	RT (min)	MH+
Cys83	76-85	VFDVIIR C FK (SEQ ID NO:271)	56,24	1239,68
Cys174; Cys191	155-193	VYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAE CL K (SEQ ID NO:272)	61,27	4673,14
Cys196	194-210	IM C EILSSLQIGDFLVK (SEQ ID NO:273)	73,14	1909,01
Cys224	211-230	VNDRRILDGMFAI C GVSDSK (SEQ ID NO:274)	58,53	2196,08
Cys235	231-240	FRTI C SSVDK (SEQ ID NO:275)	22,8	1155,57
Cys235	231-243	FRTI C SSVDKLDK (SEQ ID NO:276)	28,77	1511,79
Cys379	377-403	VP C VGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEK (SEQ ID NO:277)	81,00	3013,63
Cys445	448-472	LLNQLQY C EEAGIPLVAIIGEQLK (SEQ ID NO:278)	72,46	2784,48
Cys505; Cys509	500-509	RRTGQPL C I C (SEQ ID NO:279)	27,17	1146,57

Los resultados revelaron (datos no mostrados) que Cys235, Cys507 y Cys509 se modifican fácilmente mediante el tratamiento con yodoacetamida y, por lo tanto, probablemente sean residuos expuestos en la superficie que son fácilmente susceptibles de modificación química.

EJEMPLO 4

CREACIÓN DE POLIPÉPTIDOS DE HRS MODIFICADOS CON CONTENIDO DE CISTEÍNA ALTERADO

Para determinar si alguno de los 10 residuos de cisteína de origen natural en el HRS de longitud completa podría mutarse a residuos de aminoácidos de origen natural alternativos, o eliminarse, se diseñaron cebadores para mutar selectivamente cada residuo de cisteína. Para conseguir esto, se pueden usar cebadores basados en lo siguiente (véase la **tabla E2**).

Tabla E2		
Mutación	Secuencias de oligonucleótidos	SEQ ID NO
C83	5'- GTTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAG-3' (Directo)	280
C83	5'- CTG CAC CGT GGC GCT TGA AGC AAC GGA TGA TTA CGT CAA AC -3' (Inverso)	281
C174	5'- GCCGATACCGGGAATTCTACCAAGTGTGATTTTGACATTGCTGGG-3' (Directo)	282
C174	5'- CCC AGC AAT GTC AAA ATC ACA CTG GTA GAA TTC CCG GTA TCG GC -3' (Inverso)	283
C191	5'- CCATGATCCCTGATGCAGAGTGCCTGAAGATCATGTGCGAG-3' (Directo)	284
C191	5'- CTC GCA CAT GAT CTT CAG GCA CTC TGC ATC AGG GAT CAT GG -3' (Inverso)	285
C196	5'- GCAGAGTGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCACTTC-3' (Directo)	286
C196	5'- GAA GTG AAC TCA GGA TCT CGC ACA TGA TCT TCA GGC ACT CTG C -3' (Inverso)	287
C224	5'- CTAGATGGGATGTTTGCTATCTGTGGTGTCTTGACAGCAAGTTC-3' (Directo)	288
C224	5'- GAA CTT GCT GTC AGA AAC ACC ACA GAT AGC AAA CAT CCC ATC TAG -3' (Inverso)	289
C235	5'- CAGCAAGTCCGTACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCTGG-3' (Directo)	290
C235	5'- CCA GCT TGT CTA CTG AGG AGC AGA TGG TAC GGA ACT TGC TG -3' (Inverso)	291
C379	5'- GGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGG-3' (Directo)	292
C379	5'- CCC CAA TGC TGA GCC CCA CAC ATG GCA CCT TGC GCC C -3' (Inverso)	293
C455	5'- CTGAACCAAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCC-3' (Directo)	294
C455	5'- GGG ATG CCT GCC TCC TCA CAG TAC TGT AAC TGG TTC AG -3' (Inverso)	295
C507	5'- GAGAACAGGCCAGCCCCTCTGCATCTGCTAGAACCCAGC-3' (Directo)	296
C507	5'- GCT GGG TTC TAG CAG ATG CAG AGG GGC TGG CCT GTT CTC -3' (Inverso)	297

C509	5'- CCAGCCCCTCTGCATCTGCTAGAACCCAGCTTTCTTG-3' (Directo)	298
C509	5'- CAA GAA AGC TGG GTT CTA GCA GAT GCA GAG GGG CTG G-3' (Inverso)	299
Eliminación de los 3 últimos codones	5' GAACAGGCCAGCCCCTCTAGAACCCAGCTTTCTTG 3' (Directo)	300
Eliminación de los 3 últimos codones	5'- CAA GAA AGC TGG GTT CTA GAG GGG CTG GCC TGT TC -3' (Inverso)	301

Para confirmar los datos de titulación del sitio activo, se analizó la estructura cristalina de HRS de longitud completa usando el programa Getarea1.1 para evaluar la ubicación relativa de los 10 residuos de cisteína. Los resultados (datos no mostrados) sugieren que además de C235, C507 y C509, las cisteínas en las posiciones C174, C191 y C224 de la SEQ ID NO:1, están expuestas al menos parcialmente en la superficie y probablemente podrían modificarse mediante reactivos estándar. Adicionalmente, el análisis de la estructura cristalina de HRS sugiere que C174 y C191 son capaces de formar un enlace disulfuro interno, mientras que C507 y C509 son capaces de formar enlaces disulfuro entre cadenas dentro del dímero de HRS, ambos contribuyendo potencialmente a la microheterogeneidad que podría eliminarse de manera beneficiosa.

10

Para evaluar directamente la importancia de los dos residuos de cisteína C-terminales para contribuir a la formación de enlaces disulfuro entre cadenas, se compararon las versiones etiquetadas con His de la longitud completa y las versiones C-terminales eliminadas de HRS (HRS(1-506)) mediante análisis de SDS-PAGE antes y después de la reducción. Los resultados, que se muestran en la **figura 3**, demuestran que la HRS de longitud completa es una mezcla ~50:50 de dímeros no covalentes y unidos a SS, mientras que HRS(1-506) reduce drásticamente el dímero unido a SS. La comparación de las dos proteínas por ELISA competitivo, como se describe a continuación, reveló que ambas proteínas tenían valores de CI50 comparables con respecto a la unión del anticuerpo Jo-1 (datos no mostrados). La formación de enlaces disulfuro entre cadenas drásticamente reducida asociada con HRS(1-506) sugiere que esta variante es un punto de partida adecuado para el desarrollo de formas mejoradas de productos de

20 nueva generación.

Para determinar si cualquiera de los cuatro residuos de cisteína parcialmente expuestos en la HRS de longitud completa podría mutarse a los residuos de aminoácidos de origen natural alternativos, se diseñaron cebadores para mutar selectivamente los residuos C174, C191, C224 y C235. Para conseguir esto, se usaron los siguientes

25 cebadores que se enumeran en la **tabla E3**:

Tabla E3		
Mutación	Secuencia de oligonucleótidos	SEQ ID NO:
C191A	CCCGGATGCCGAGGCTTTGAAAATTATGTG (Directo)	302
C191A	CAC ATA ATT TTC AAA GCC TCG GCA TCC GGG (Inverso)	303
C191S	GATCCCGGATGCCGAGAGTTTGAAAATTATGTGTG (Directo)	304
C191S	CAC ACA TAA TTT TCA AAC TCT CGG CAT CCG GGA TC (Inverso)	305
C191V	GATCCCGGATGCCGAGGTTTGAAAATTATGTGTG (Directo)	306
C191V	CAC ACA TAA TTT TCA AAA CCT CGG CAT CCG GGA TC (Inverso)	307
C174A	CGCGAATTCTATCAGGCTGATTTTGATATTGCCGG (Directo)	308
C174A	CCG GCA ATA TCA AAA TCA GCC TGA TAG AAT TCG CG (Inverso)	309
C174V	CGCGAATTCTATCAGGTTGATTTTGATATTGCCGG (Directo)	310
C174V	CGG CAA TAT CAA AAT CAA CCT GAT AGA ATT CGC G (Inverso)	311
C224S	GGTATGTTTGCTATTTCCGGTGTTTCTGATTCC (Directo)	312
C224S	GGA ATC AGA AAC ACC GGA AAT AGC AAA CAT ACC (Inverso)	313
C235S	CCAAATTCCGTACAATCTCCTCAAGCGTGACAAAATTGG (Directo)	314

C235S	CCA ATT TGT CCA CGC TTG AGG AGA TTG TAC GGA ATT TGG (Inverso)	315
C191A	CCCGGATGCCGAGGCTTTGAAAATTATGTG (Directo)	316
C191A	CAC ATA ATT TTC AAA GCC TCG GCA TCC GGG (Inverso)	317

Se introdujeron mutaciones por mutagenia usando el kit de mutagenia dirigida QuikChange Lightning (Agilent, n.º cat. 210518) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la mutagenia, las muestras se trataron con enzima Dpn I a 37 °C y se transformaron en células competentes de oro XL10 usando procedimientos rutinarios. Se cultivan múltiples colonias en caldo Terrific durante una noche a 37 °C y los plásmidos resultantes se purifican con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen n.º cat. 27106). Los plásmidos se secuencian para confirmar la identidad de la sustitución de aminoácidos de cada clon. Los clones representativos se transformaron en células competentes NovaBlue (Novagen n.º cat. 70181) y se cultivaron en 250 ml de medio M9YE a 37 °C durante una noche. Se realizó una preparación máxima con el kit HiSpeed Plasmid Maxi (Qiagen n.º cat. 12663) para crear una reserva de plásmidos de mutantes para su posterior análisis. La concentración y la pureza se determinaron midiendo A260, A280 y A230. Los plásmidos purificados se almacenaron a -20 °C antes de la transfección en células de *E. coli* o de mamífero de acuerdo con protocolos estándar.

Para evaluar el impacto de la mutación de cada residuo, se transformaron clones representativos en células de *E. coli* o de mamífero, y el rendimiento de producción, el contenido de endotoxinas, la estabilidad y la actividad relativa se midieron en un ensayo ELISA para determinar la unión de anticuerpos Jo-1 como se describe más adelante.

Producción de proteínas. Se transformaron células competentes BL21 (DE3) (Novagen, n.º cat. 69450) o W3110 (ATTC) con la construcción de expresión con optimizaciones de codones que codifican las construcciones de cisteína reducidas tal como se ha descrito anteriormente. El sistema de expresión, los medios de fermentación, las condiciones de fermentación y las etapas de purificación usados para producir proteínas recombinantes fueron esencialmente los mismos que los descritos en el ejemplo 4 mostrado a continuación, después de ajustar a la escala de producción y la cantidad de pasta celular usada. La **tabla E4** a continuación muestra los rendimientos de purificación y los niveles de endotoxinas para las proteínas preparadas.

Tabla E4		
Rendimientos de purificación y niveles de endotoxinas de variantes de cisteína reducidas		
Nombre	Rendimiento (mg/g pasta celular)	Endotoxina (UE/mg)
HRS(1-506)	+++	0,32
HRS(1-506)C174V	++	0,71
HRS(1-506)C174A	++	0,30
HRS(1-506)C191A	++	0,46
HRS(1-506)C191V	+++	0,33
HRS(1-506)C1191S	+++	0,32
HRS(1-506)C224S	++	0,54
HRS(1-506)C235S	+++	0,60
+++ más de 7 mg proteína/g de pasta celular; ++ más de 5 mg/g de pasta celular + menos de 5 mg/g de pasta celular.		

Los resultados muestran que todas las variantes de Cys reducidas estaban relativamente bien expresadas, y se purificaron con éxito con bajos niveles de endotoxinas. En particular las variantes de cisteína reducidas basadas en la mutación de Cys191 y Cys235 mostraron niveles de expresión favorables; aunque todos los clones mostraron niveles de expresión razonables y bajos niveles de endotoxinas.

Para evaluar el impacto de las mutaciones de cisteína en la heterogeneidad de carga de las proteínas purificadas, las muestras de cada clon se analizaron por enfoque isoeléctrico. Las muestras (10 µg) se cargaron en un gel de enfoque isoeléctrico (pH 3-10) usando un gel IEF de Life Technologies Novex de pH 3-10 de 1,0 mm (n.º cat. P/N EC6645BOX), marcador IEF Novex 3-10 (n.º cat. P/N 391201), kit de tampón IEF Novex pH 3-10 (n.º cat. P/N LC5317), se hicieron pasar con tampón de cátodo 1X (cámara superior) y tampón de ánodo 1X (cámara inferior) a 100 V durante 1 hora, 200 V durante 1 hora y 500 V durante 30 minutos. Los geles se fijaron con TCA al 12 % con ácido sulfosalicílico al 3,5 % durante 30 minutos y se tiñeron con Expedeon InstantBlue (n.º cat. P/N ISB1L). Los datos (resultados no mostrados) demuestran que la mutación de la cisteína en la posición 174 redujo significativamente la heterogeneidad de punto isoeléctrico, consecuente con la posibilidad de que este residuo de cisteína experimente una formación de enlace de disulfuro intramolecular con cisteína 191.

Para evaluar el impacto de las modificaciones de cisteína en la estabilidad térmica, la propensión a la agregación, la estructura y la actividad de ARNt sintetasa de las proteínas resultantes, se evaluaron las proteínas por fluorimetría diferencial de barrido, HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC), ELISA competitivo y titulación de sitios activos. Los resultados se muestran en la **tabla E5** más adelante.

5

Se realizó fluorimetría diferencial de barrido en muestras de proteínas monitorizando la fluorescencia en función de la intensidad de fluorescencia de un colorante lipófilo durante desnaturalización térmica. Los estudios se llevaron a cabo en muestras después de ser diluidos a 0,5 mg/ml en un volumen final de 100 μ l de PBS pH 7,0 (NaCl 150 mM, fosfato 20 mM) y mezclados con una solución de colorante de desplazamiento térmico, que se preparó diluyendo la solución madre (Applied Biosystems/Life Technologies, P/N 4461146) 20 veces en agua destilada ultrapura (Gibco, P/N 10977). Se añadieron cinco μ l del colorante diluido a 100 μ l de muestra. La mezcla se sembró en una placa de reacción óptica transparente de 384 pocillos (Applied Biosystems/Life Technologies P/N 4309849) a 20 μ l cada pocillo y replicados de 4 pocillos por muestra. La placa se leyó mediante ViiA 7 Real Time PCR Instrument (Applied Biosystems/Life Technologies, P/N 4453552). El protocolo de desnaturalización térmica comenzó con un cambio de velocidad de 1,6 °C/s, hasta que se alcanzó una temperatura de 25 °C, punto en el cual el instrumento se mantuvo a esta temperatura durante 2 minutos, antes de aumentar adicionalmente la temperatura a 99 °C, a una velocidad de 0,5 °C/s punto en el cual se mantuvo esta temperatura durante 2 minutos más.

El análisis por HPLC de exclusión por tamaño se completó en las muestras de proteína purificada usando TSKgel Super SW3000, DI 4,6 mm x 30 cm, tamaño de partícula 4 μ m, columna 250 Å (Tosoh, 18675) usando una fase móvil de fosfato de Na 200 mM, NaCl 150 mM pH 7,0, a un caudal de 0,3 ml/min, con un sistema HPLC Agilent 1260 equipado con un desgasificador de vacío, bomba binaria/cuaternaria, muestreador automático con termostato, compartimento de columna con termostato, detector de matriz de diodos (DAD) y software de cromatografía Chemstation). Se inyectaron muestras no diluidas (40 μ g) de cada proteína después de una breve centrifugación. Se usó una muestra de adecuación del sistema (albúmina de suero bovino, BSA, Thermo Scientific, P/N: 23209) y un control interno (HRS de tipo silvestre) para encuadrar las muestras y garantizar la validez de la prueba.

Se realizaron ensayos ELISA competitivos en placas de 96 pocillos (Immulon 4HBX) que se habían revestido con una solución de 50 μ l de HARS con etiqueta His de longitud completa, ajustada a una concentración de 2 μ g/ml con PBS. Se sellaron las placas y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Antes de usar, se lavaron las placas cinco veces con PBST y posteriormente se bloquearon con 100 μ l de BSA al 1 % en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Mientras las placas ELISA estaban bloqueadas, se incubaron las moléculas de competencia de cisteína reducida (en un intervalo de concentración de 1×10^{-6} M a 1×10^{-13} M) con anticuerpos α -Jo-1 (GenWay GWB-FB7A3D o Immunovision HJO-0100) a dilución 1:10.000 en BSA al 1 % en PBS en una placa de incubación separada (Costar 3357 de 96 pocillos) durante una hora a 4 °C. Después de finalizar el bloqueo, se lavaron las placas de ELISA tres veces con PBST y se añadieron 50 μ l de solución que contenía anticuerpo y competidor a la placa de ELISA y se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Después de la incubación de unión inicial, se lavaron las placas cinco veces con PBST. A continuación se añadieron, 50 μ l de anticuerpo de detección (IgG F(ab')₂:HRP antihumana de cabra AbD Serotec 0500-0099) a una dilución 1:5.000 y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación de unión secundaria, se lavaron las placas con cinco veces con PBST y se añadieron 50 μ l de sustrato TMB (Thermo Scientific Pierce TMB Substrate PI-34021). Las reacciones prosiguieron durante 8 minutos hasta el momento en que se añadieron 50 μ l de solución de detención de ácido sulfúrico 2 M. Se realizó cuantificación colorimétrica con un lector de placas SpectraMax a 450 nM.

45

Para determinar el número de sitios activos catalíticos en cada variante de cisteína HARS506 se empleó el ensayo de titulación de sitios activos (tal como se describe en Fersht y col., (1975) Biochemistry). En resumen, los ensayos se realizaron a temperatura ambiente con HARS 5 μ M, MgCl₂ 10 mM, ATP 50 μ M, L-histidina 20 mM, 2 μ g/ml de pirofosfatasa inorgánica, [γ -32P]ATP 1,65 μ M en tampón estándar (HEPES 100 mM pH 7,5, KCl 20 mM). Las reacciones se iniciaron con enzima en placas PCR de perfil bajo y se inactivaron los puntos temporales en placas de filtro MultiScreen PVDF de 96 pocillos Millipore que contenían suspensión de HClO₄/carbón (suspensión 1:4 de HClO₄ al 7 %:carbón al 10 %) a 30 s, 1 min, 2 min, 4 min, 6 min y 10 min. Después de mezcla y pipeteo, se agitaron las muestras en una placa de recogida con centelleo Supermix, y se contaron con un lector de placas Microbetae.

50

Tabla E5				
Efecto de modificación de cisteínas en la estabilidad térmica, la agregación y la actividad de HARS				
Nombre	T _m	% de agregados de bajo peso molecular	CI50 mediante ensayo ELISA	Titulación de sitios activos
HRS(1-506)	49,0	2,0	0,15	63,3

HRS(1-506)C174V	47,8	7,8	0,39	55,5
HRS(1-506)C174A	49,2	3,0	0,19	59,8
HRS(1-506)C191A	44,7	5,1	0,14	66,2
HRS(1-506)C191V	47,8	1,8	0,16	60,8
HRS(1-506)C191S	45,8	2,3	0,16	63,2
HRS(1-506)C224S	48,9	4,9	0,14	60,5
HRS(1-506)C235S	48,8	3,1	0,14	64,6

Los resultados de estos estudios confirman que todos los mutantes de cisteína están activos, con pérdida escasa o nula de actividad, estabilidad o conformación tal como se mide por titulación de sitios activos, unión ELISA y determinaciones de T_f para desnaturalización térmica. La titulación de sitios activos de la actividad de ARNt sintetasa revela que todos los mutantes de cisteína reducida están activos, y son, de este modo, adecuados para su uso en cualquiera de las composiciones, procedimientos y kits de la presente descripción. En general, las sustituciones Cys191 mostraron menor termoestabilidad global, mientras que los mutantes Cys174 mostraron una heterogeneidad significativamente menor determinada por enfoque isoeléctrico.

10 EJEMPLO 5

CREACIÓN DE POLIPEPTIDOS DE HRS MODIFICADOS (SIN ETIQUETAS) CON TRUNCAMIENTO C-TERMINAL (HisRS^{N8}) o (HRS(1-506))

- 15 Para eliminar los últimos tres aminoácidos y el enlazador entre HisRS de tipo silvestre y la etiqueta His, se diseñaron cebadores para uso con el kit de mutagenia dirigida QuikChange Lightning (Agilent, n.º de cat. 210519). Para conseguir esto, se usan los siguientes cebadores como se enumeran en la **tabla E6**.

Tabla E6		
Mutación	Secuencia de oligonucleótidos	SEQ ID NO:
Eliminar CICAALLE	5'-CGCCGCACCGGTCAACCGTTACACCACCACCACCACCTG-3' (Directo)	318
Eliminar CICAALLE	5'- CAG TGG TGG TGG TGG TGG TGT AAC GGT TGA CCG GTG CGG TCG - 3' (Inverso)	319

- 20 La eliminación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit de mutagenia dirigida QuikChange Lightning. Después de la mutagenia, la muestra se trató con la enzima Dpn I a 37 °C y se transformó en células competentes de oro XL10 usando procedimientos de rutina. Se hicieron crecer múltiples colonias en caldo de Luria-bertani durante una noche a 37 °C y los plásmidos resultantes se purificaron con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen n.º de cat. 27106). Los plásmidos se secuenciaron para confirmar la identidad de la sustitución de aminoácidos de cada clon.
- 25 Para eliminar la etiqueta His, se diseñaron cebadores para usarlos con el kit de mutagenia dirigida QuikChange Lightning (Agilent, n.º de cat. 210519). Para conseguir esto, se usaron los siguientes cebadores como se enumeran en la **tabla E7**.

Tabla E7		
Mutación	Secuencia de oligonucleótidos	SEQ ID NO:
Eliminar etiqueta de His Directo	5'- CGC CGC ACC GGT CAA CCG TTA TGA GAT CCG GCT GCT AAC - 3'	320
Eliminar etiqueta de His Inverso	5'- GTT AGC AGC CGG ATC TCA TAA CGG TTG ACC GGT GCG GCG - 3'	321

La eliminación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit de mutagenia dirigida QuikChange Lightning, como se ha descrito anteriormente.

- 5 **Producción de proteínas.** Las células competentes BL21(DE3) (Novagen, n.º de cat. 69450) o las células W3110 (ATTC) se transformaron con la construcción de expresión con optimización de codones que codifica HisRS^{N8} (HRS(1-506)) como se describe en el ejemplo 2. El sistema de expresión, los medios de fermentación y las condiciones de fermentación usadas para producir proteínas recombinantes fueron esencialmente las mismas que las descritas en el ejemplo 2.

10

- Purificación de HisRS^{N8} sin etiqueta (HisRS(1-506)).** La pasta celular congelada (400 g) se resuspendió en 4 volúmenes (1600 ml) de tampón de lisis (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, L-cisteína 2 mM, pH 7,4). Se añadieron a la suspensión comprimidos completos de inhibidor de proteasa LIBRE de EDTA (Roche, N° de cat. 05 056 489 001) en una proporción de 1 comprimido/50 ml. La suspensión se hizo pasar a través de un microfluidizador (Microfluidics) dos veces a 18.000 psi con enfriamiento con hielo. El lisado se centrifugó a 15.000 x g durante 45 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de 2-3 cápsulas AcroPak 1500 (0,8/0,2 µm, Pall, PN12675).

15

- El lisado clarificado se cargó en una columna Q HP de 382 ml (5 x 19,5 cm) previamente equilibrada con tampón Q A (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4). El producto se eluyó con un gradiente lineal del 0-30 % de Tampón Q B (Tris 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,4) en 10 volúmenes de columna (VC). Las fracciones se recogieron a 1/2 VC/fracción y se analizaron mediante SDS-PAGE. La agrupación se basó en el análisis de gel.

20

- Se añadió una solución de sulfato de amonio 3,5 M al agrupamiento de Q HP anterior hasta una concentración final de 1,2 M. La mezcla se filtró a través de un AcroPak 200 (0,2 µm) y se cargó en una columna Phenyl HP de 481 ml (5 x 24,5 cm) previamente equilibrada con Tris 20 mM, sulfato de amonio 1,2 M, pH 7,0. El producto se eluyó con un gradiente lineal de sulfato de amonio 1,2 - 0 M en Tris 20 mM/pH 7,0 a en 10 VC. Se agruparon las fracciones (1/2 VC/fracción) que contenían el producto basándose en el análisis SDS-PAGE.

25

- El agrupamiento de Phenyl de arriba se concentró a 0,5 l mediante un sistema TFF, que consiste en un soporte de casetes Pellicon Mini (Millipore N° de cat. XX42PMINI), una bomba Masterflex I/P y 2 casetes de 0,1 m² (30 kD MWCO, Novasep N° de cat. PP030M01L). La solución concentrada se intercambió a continuación con tampón con 6 diavolúmenes (3 l) de Tampón CHT A (fosfato sódico 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0). El material retenido se filtró a través de un filtro Millex GP-50 de 0,2 µm (Millipore número de pieza SLGP 05010) antes de continuar con la siguiente etapa.

35

- La solución anterior se cargó en una columna de 380 ml de hidroxiapatita cerámica (CHT) (5x19,4 cm) previamente equilibrada con Tampón CHT A. La columna se lavó con tampón A y se siguió con un tampón B al 6 % (fosfato de sodio 500 mM, 150 , NaCl mM, pH 7,0). El producto se eluyó con un gradiente lineal del 6-56 % de tampón B en 10 VC. Se agruparon las fracciones (1/2 VC/fracción) que contenían el producto basándose en el análisis SDS-PAGE.

40

- Usando el mismo sistema de TFF, el agrupamiento de CHT se concentró a ~0,2 l, el tampón se intercambió con 6 diavolúmenes del tampón de formulación actual (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0) y se concentró a una concentración diana de ~10 mg/ml. La solución del producto se filtró a través de un filtro Millex GP-50 de 0,2 µm (Millipore número de pieza SLGP 05010) y se almacenó en un congelador a -80 °C.

45

EJEMPLO 6

EVALUACIÓN DE RESOKINE (HRS(1-60)) COMO UN AGENTE INFLAMATORIO

- 50 Para evaluar la potencial propiedad antiinflamatoria de los polipéptidos derivados de HRS, se probó una variante de splicing natural N-terminal que comprendía los aminoácidos 1-60 de HRS («Resokine») en un modelo de colitis inducida por TNBS. Los estudios se realizaron en ratones BDF-1 machos, con 12 ratones/grupo; se añadió budesonida a 5 mg/kg por vía oral.

- 55 En este estudio, se administró Resokine diariamente mediante inyección IV, comenzando 3 días antes del tratamiento con TNBS, a una concentración de 1 o 5 mg/kg. Los datos que se muestran en la figura 4 demuestran que el tratamiento con Resokine a cualquiera de las concentraciones dio como resultado un aumento significativo de la supervivencia. Por consiguiente, Resokine parece tener potentes efectos antiinflamatorios, compatibles con la hipótesis de que los polipéptidos de HRS están implicados en el control local de los procesos inflamatorios.

60

EJEMPLO 7**EVALUACIÓN DE POLIPÉPTIDOS DE HRS PARA EL TRATAMIENTO DE MIOSITIS Y RABDOMIOLISIS INDUCIDAS POR ESTATINAS**

5

Las estatinas son inhibidores de la HMG CoA reductasa que inhiben la síntesis de mevalonato, la etapa limitante de la velocidad en la síntesis de colesterol. El tratamiento con estatinas ha demostrado ser beneficioso para reducir los niveles de colesterol en los pacientes. Sin embargo, los efectos secundarios y las complicaciones de la terapia con estatinas incluyen debilidad muscular, miositis y rabdomiolisis. La miopatía muscular es una complicación con varias

10

estatinas en el mercado y los pacientes a menudo interrumpen su tratamiento con estatinas si presentan alguno de estos síntomas. Al igual que muchas otras miopatías, distrofias musculares y trastornos inflamatorios del músculo, la progresión de la enfermedad en la miopatía inducida por estatinas parece ocurrir como resultado de una lesión química, genética o física inicial, que se inflama cada vez más como resultado de la invasión de células inmunitarias en las células musculares dañado.

15

Por consiguiente, la miopatía inducida por estatinas representa un sistema modelo ampliamente aplicable para estudiar la miositis inducida por fármacos, que es directamente aplicable a otras miopatías y distrofias musculares, todas las cuales comparten un componente inflamatorio común que media la progresión de la enfermedad promoviendo la invasión de células inmunitarias del tejido muscular dañado.

20

El propósito de este estudio fue evaluar la eficacia de HRS(1-506) para revertir los efectos de la miositis muscular inducida por estatinas, como lo indican los niveles de enzimas circulantes alterados, y los cambios en la expresión génica de la función muscular y los marcadores inflamatorios en respuesta al tratamiento con HRS(1-506).

25

Para conseguir esto, las ratas recibieron una dosis diaria de 1 mg/kg de cerivastatina y a continuación se cambiaron a una dosis cada dos días (qod) con cerivastatina. El objetivo de este régimen de dosificación era mantener un estado de enfermedad sostenido en los animales, pero no tener una enfermedad tan grave como para que la supervivencia de la rata se viera afectada en gran medida. La eficacia de un intervalo de dosis de HRS(1-506) se evaluó a continuación en ratas después de que la dosificación de estatinas ya había iniciado cambios medibles en

30

los marcadores de miositis circulantes.

Protocolo y procedimientos. En este estudio, se trataron ratas Sprague-Dawley hembra de 10 semanas de edad con 1 mg/kg de cerivastatina ((Sigma, N° de cat. SML0005) en metilcelulosa al 0,5 %, a partir del día 1 mediante sonda oral. Después de 7 días de administración diaria, las ratas se cambiaron a una estrategia de dosificación cada dos días (qod) en los días 9, 11 y 13. La administración de HRS(1-506) y de vehículo se iniciaron el día 6 mediante inyección intravenosa y a las ratas se les administraron dosis diariamente hasta el día 14 (se muestra esquemáticamente en la **figura 5A**). Todas las ratas se sometieron a disminución programada el día 15, 24 horas después de la dosis final del artículo de prueba y 48 horas después de la última administración de estatinas. Se administró HRS(1-506) a 3 dosis (0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg) en NaPO₄ 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,0 diariamente.

40

Para abordar el objetivo principal de este estudio, se realizaron las siguientes mediciones y criterios de valoración del estudio: supervivencia de ratas, peso, niveles de CK en suero circulante los días 12 y 15, tinción con H&E en muestras de isquiotibiales el día 15, ELISA de troponina I, hemograma completo en sangre del día 15, qPCR en muestras de isquiotibiales y niveles de HARS endógenos en suero.

45

Procedimientos de qPCR. Se extirparon los isquiotibiales de ratón de los animales y se almacenaron a -80 °C hasta el análisis. El tejido se preparó en grupos de 10 isquiotibiales usando el kit RNeasy Fibrous Tissue Midi de Qiagen (n.º de catálogo 75742). Una vez que el ARN se eluyó de la columna Qiagen, se hizo pasar por un Bioanalyzer 2100 de Agilent para poner a prueba la integridad del ARN y un NanoDrop para determinar la concentración y pureza del ARN. A continuación se almacenó el ARN a -80 °C.

50

La transcripción inversa (RT) de ARN a ADNc se realizó en un formato de placa de PCR de 96 pocillos en la máquina de PCR Mastercycler de Eppendorf con el siguiente programa: 37 °C durante 60 minutos, 95 °C durante 5 minutos. Los pocillos de borde de la placa de 96 pocillos no se usaron y se llenaron con 50 µl de agua para evitar la evaporación de los pocillos internos. Se usaron 20 µl de ARN y 30 µl de la mezcla maestra de transcripción inversa (TaqMan PreAmp Cells to CT Kit de Ambion n.º de catálogo 4387299) por muestra de RT. Una vez que se completó la RT, la siguiente etapa fue amplificar previamente los genes de interés en la muestra de ADNc. Se combinaron cebadores de genes de interés (cebadores DELTAgene diseñados por Fluidigm) hasta una concentración final de 200 nM. Usando estos cebadores, los genes de interés se amplificaron previamente en cada muestra. La preamplificación se realizó en reacciones de 10 µl (2,5 µl de ADNc, 7,5 µl de mezcla maestra Pre-

55

60

AMp) en formato de 384 pocillos usando una máquina de PCR ViiA7 de Applied Biosystems con el siguiente programa: 95 °C durante 10 minutos, 14 ciclos de 95 °C Durante 15 segundos y 60 °C durante 4 minutos. Después de la etapa de preamplificación, se añadió exonucleasa (New England BioLabs n.º de catálogo M0293L) para eliminar los cebadores no incorporados de cada muestra. Esta reacción de exonucleasa también se completó en la

- 5 máquina de PCR ViiA7 con el siguiente programa: 37 °C durante 30 minutos, 80 °C durante 15 minutos. Después de la exonucleasa, la muestra de RT se diluyó adicionalmente a 1:5 (7 mcl de muestra de exonucleasa + 18 mcl de tampón de EDTA bajo).

- El chip usado para ejecutar qPCR en el sistema Biomark de Fluidigm fue un 96.96 Dynamic Array IFC para la expresión génica. El chip se cebó primero con el controlador IFC HX de acuerdo con las recomendaciones del fabricante antes de cargar la muestra y los ensayos. Para preparar los ensayos que se cargarán en un chip, se prepararon 4,4 mcl de la mezcla maestra del ensayo (reactivo de carga del ensayo 2X de Fluidigm n.º de catálogo 8500736 y bajo EDTA TE) a 3,6 mcl los cebadores directos e inversos de 20 mM para cada gen de interés se prepararon en una placa de 96 pocillos. Para preparar muestras, se añadieron 4,5 mcl de mezcla maestra de muestra (Mezcla maestra de expresión de genes TaqMan 2X de Ambion, Reactivo de carga de ADN 20X de Fluidigm, número de catálogo 100-0388, y 20X EvaGreen de Biotium n.º de catálogo 31000) a 3 mcl de muestra diluida preamplificada/exonucleasa en una placa de 96 pocillos. Una vez que se había cebado el chip, se cargaron en el chip 5 mcl de una muestra o ensayo preparado anteriormente. El chip fue devuelto a continuación al controlador de IFC para que las muestras se carguen en el chip. Una vez que el chip terminó de cargarse, la qPCR
- 10 podía ejecutarse en el Biomark usando un programa preestablecido para 96.96 Dynamic Array para la expresión génica con una curva de fusión para determinar la especificidad del cebador. La expresión génica relativa se determinó mediante el procedimiento Ct delta delta.

- Cuantificación de HARS extracelular.** Se desarrolló internamente un ELISA basado en 96 pocillos usando 2 anticuerpos monoclonales anti-HARS de ratón M03 (Sigma n.º SAB1403905 y Abnova n.º H00003035-M03) y M01 (Abgent n.º AT2317a) en un formato de sándwich para detectar HARS en suero de rata. Los ensayos se realizaron en placas Costar de 96 pocillos (placa Costar de 96 pocillos n.º 3369) usando una curva estándar de siete puntos que se generó en un intervalo de 75 a 0,1 ng/ml usando una solución madre de HRS(1-506); (7,5 mg/ml en NaPO₄ 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,0, usando 1x PBST (Tween-20 al 0,05 %) como diluyente). El clon monoclonal de ratón
- 25 M01, clon 1C8 (Abgent n.º AT2317a) se biotiniló internamente y se usó como el anticuerpo de detección, y el anticuerpo monoclonal de ratón M03 (Sigma n.º SAB1403905, n.º de lote 11238, 0,5 mg/ml y Abnova n.º H00003035-M03, n.º de lote 11238, 0,5 mg/ml) se usó como un anticuerpo de captura. Se usó caseína (Thermo Scientific n.º 37528) como agente de bloqueo, y se usó 1x PBST (Tween-20 al 0,05 %) como tampón de lavado. La unión del anticuerpo se cuantificó usando estreptavidina-HRP (Invitrogen n.º de cat 434323, n.º de lote 816755A)
- 30 usando sustrato TMB (Thermo n.º 34021) y con ácido sulfúrico 2 M como solución de detención.

- Los ensayos ELISA se realizaron revistiendo las placas durante una noche con de 0,6 a 2 µg/ml de anticuerpo M03 en 1X PBS, que a continuación se bloquearon mediante incubación con caseína durante una hora, y se lavaron 3x con PBST. Las placas se incubaron a continuación con estándares y muestras durante 1 hora, se lavaron 3 x PBST
- 40 y a continuación se incubaron con 500 ng/ml de M01 biotinilado diluido en PBST, 1 hora, se lavaron 3 x PBST, se incubaron con 200 ng/ml de estreptavidina-HRP durante 1 hora, se lavaron 3x con PBST y a continuación se añadió el sustrato TMB durante 4 minutos. Las reacciones se detuvieron con la solución de detención y se leyó la absorbancia a 450 nm.

- 45 Los resultados se cuantificaron basándose en la curva estándar basándose en los valores de absorbancia bruta promedio sin sustracción de fondo. Se usó Prism para el ajuste de curvas estándar. Modelo: ajuste de Log(agonista) frente respuesta [regresión logística de 4 parámetros] El porcentaje de recuperación se calculó para cada punto de concentración individual (no promediado) mediante:

$$\frac{(\text{medido} - \text{real}) \times 100 \%}{(\text{real})}$$

- 50 **Otras lecturas.** Las ratas se pesaron diariamente. Las muestras de suero se tomaron los días 1, 8, 12 (a través de la vena caudal) y el día 15 (terminal) para usarse para el análisis de enzimas circulantes (Idexx) y mediciones de la troponina-I del músculo esquelético, se midieron con un kit comercial de ELISA. El análisis de orina se realizó los días 3, 5, 8, 10, 12 y 15 antes de la dosificación en ese día. El análisis de hemograma completo se realizó en sangre
- 55 aislada el día 15 antes de sacrificar las ratas. El día 15, las ratas se sacrificaron y se colocó una parte del músculo isquiotibial y el pulmón (no inflado) en NBF al 10 % para la inclusión en parafina y la tinción con H&E de las secciones (Premier Laboratory). Otra parte del músculo isquiotibial y el pulmón se colocó a -80 °C para usar en la extracción y perfilado de ARN. El hígado, el riñón y el corazón también se aislaron el día 15 y se colocaron en zinc-

formalina para inclusión en parafina (TSRI Histology) para el almacenamiento de tejido a largo plazo.

Resultados. Hubo un 100 % de supervivencia en este estudio, y todas las ratas sobrevivieron a la disminución programada programado el día 15. Las ratas con dosis de estatina tenían pesos promedio más bajos que las ratas de control que no recibieron estatina. El día 15, el grupo de estatinas + vehículo tenía el peso promedio más bajo de rata de todos los grupos, mientras que el grupo de estatinas + 3 mg/kg de HRS(1-506) tenía el promedio de peso más alto de todos los animales tratados con estatinas (datos no mostrados). El análisis de hemograma completo mostró patrones similares globales de cambios entre diferentes grupos de tratamiento de animales (datos no mostrados).

Se observó un pequeño aumento de la CK sérica en ratas tratadas con estatina en comparación con los controles no tratados los días 12 y 15. El día 12, las ratas a las que se les administró dosis de 1 mg/kg y 3 mg/kg de HRS(1-506) tuvieron promedios de CK más pequeños y ajustados en comparación con los animales tratados con estatina + vehículo (**figuras 6A-B**), consecuente con un impacto positivo del tratamiento con HRS(1-506) sobre la miositis inducida por estatinas, también consecuente con un efecto positivo de HRS(1-506) sobre la función muscular, los niveles de troponina C muscular también se redujeron en animales tratados con HRS(1-506) (**figura 5B**). Además, los niveles séricos endógenos de HRS se elevaron en las ratas tratadas con estatina en comparación con las ratas que no recibieron estatina (**figura 7**), lo que sugiere que la liberación de HRS puede jugar un papel como regulador endógeno de la inflamación muscular. La tinción de H&E en los isquiotibiales demostró una reducción en las puntuaciones de degeneración/necrosis e inflamación muscular en ratas tratadas con estatinas a las que se les administró 1 mg/kg y 3 mg/kg de HRS(1-506) en comparación con ratas a las que se administró vehículo y 0,3 mg/kg de HRS(1-506) (**figura 8**).

Para investigar más a fondo la base mecánica de los efectos de HRS sobre la miopatía inducida por estatinas, se examinaron los cambios en la expresión génica en los isquiotibiales de los animales tratados después de la finalización del estudio. El perfil de ARN se realizó en los músculos isquiotibiales aislados de las ratas el día 15 como se ha descrito anteriormente. Los resultados de estos estudios demostraron que los 13 genes que se elevaron más de 5 veces en respuesta al tratamiento con estatinas se redujeron con el tratamiento con HRS(1-506) (véase la **tabla E8 y las figuras 9-10**).

Tabla E8			
Gen regulado en más de 25 veces	Gen regulado en más de 10 veces	Gen regulado en más de 4 veces	Sin cambios
CD8a	MCP1	CD11a	HARS
MMP9	CD8b	CD11b	HARS2
IL6	CCR5	CD45	DARS
IL10	CD18	SDC1	GARS
		IFNg	QARS

Perfil transcripcional de isquiotibiales de ratas tratadas con estatina: reveló que 10 genes relacionados con la diabetes/el síndrome metabólico (**figura 11**) y varios genes de mantenimiento (datos no mostrados) no se vieron afectados significativamente por el tratamiento con HRS. Por el contrario, el perfil transcripcional de los isquiotibiales de ratas tratadas con estatina de 26 genes marcadores de células inmunitarias reveló cambios significativos en un mayor número de genes (véase **las figuras 12-14**), incluyendo la inhibición dependiente de la dosis de ITGAL (CD11a), CD11b, CD8a, CD8b, CD18, CCR5, PTPPC y la expresión (CD45R). Además, HRS(1-506) fue eficaz para reducir la expresión de varios genes marcadores inflamatorios, incluidos IL6, MCP1, IL10 e IFN gamma (véase **las figuras 15-16**). También se observaron cambios transcripcionales en 14 genes relacionados con la adhesión, el desarrollo y la fibrosis (véase **las figuras 17-18**), el gen de la contractilidad muscular Neb (datos no mostrados) y en genes asociados con atrofia muscular progresiva, atrofia y miogénesis (véase **las figuras 19-20**).

Conclusiones. Se observó una disminución de la CK, la troponina I en suero y la degeneración/necrosis de las células musculares y la inflamación muscular en animales que recibieron dosis más altas de HRS(1-506), ya sea a 1,0 mg/kg o 3,0 mg/kg en contraste con los animales que recibieron, bien vehículo o bien dosis bajas de 0,3 mg/kg de HRS(1-506). Los datos de perfiles de ARN respaldaron estos resultados al demostrar la expresión reducida de CD8a, IL-6, MCP-1 y MMP-9 en los isquiotibiales de ratas tratadas con estatina que recibieron dosis más altas de HRS(1-506). La regulación positiva de estos genes es más probable debido al aumento del infiltrado de células inmunitarias en el tejido muscular dañado. Basándose en la identidad de los genes expresados, es probable que las células inmunitarias infiltrantes estén formadas por uno o más de los siguientes tipos de células, linfocitos T, células dendríticas, linfocitos NK y macrófagos/monocitos. Todos estos tipos de células se han asociado con la inflamación muscular, y la capacidad de los polipéptidos de HRS, incluyendo HRS(1-506) para mediar una inhibición drástica de

esta afluencia de células inmunitarias, sugiere que los polipéptidos de HRS tales como HRS(1-506) representan inmunorreguladores potentes, que son capaces de actuar como inmunomoduladores potentes en una amplia gama de enfermedades y trastornos inflamatorios y autoinmunitarios.

5 EJEMPLO 8

PREPARACIÓN DE POLIPÉPTIDOS HRS-FC

Se prepararon, purificaron y analizaron las proteínas de fusión N-terminal y C-terminal Fc-histidil-ARNt sintetasa (HRS-Fc) de la siguiente manera.

Construcción de plásmidos. El dominio Fc de la IgG1 humana se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) antes de insertarse en el extremo C o en el extremo N del polipéptido de HRS, HRS(1-60), mediante reacciones de PCR secuenciales usando los cebadores a continuación y los fragmentos de ADN amplificados resultantes insertados en el extremo C o en el extremo N de HRS(1-60) ubicado en el vector de expresión pET28 (Novagen 69864). Se apreciará que la creación de la proteína de fusión Fc N-terminal da como resultado la eliminación/sustitución de la metionina N-terminal en HRS(1-60) con el aminoácido C-terminal del dominio Fc, y viceversa, donde sea apropiado.

Se usaron los siguientes cebadores para crear la proteína de fusión Fc HRS(1-60) fusionada en el extremo N (Fc-HRS(2-60)) (**tabla E9**):

Tabla E9		
Secuencias de cebadores		
Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
FcNSV9-F	TAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCTGACAAAACCTC ACACATGCCC	323
FcNSV9tail	AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGCGTGCGGCGCTGG	324
FcNSV9-R	CCAGCGCCGCACGCTCTGCTTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	325
FcNSV9-F2	TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCTGACAAAACCTCACA CATGCCC	326
FcNSV9tail2	CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGCGTGCGGCGC	327
FcNSV9-R2	GCGCCGCACGCTCTGCTTTACCCGGAGACAGGGAGAG	328

Se usaron los siguientes cebadores para crear la proteína de fusión HRS (1-60) Fc fusionada en el extremo C (HRS(1-60)-Fc) (**tabla E10**).

Tabla E10		
Secuencias de cebadores		
Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
FcCSV9-F	CAAACAGAAATTTGTGCTCAAAACCCCCAAGTCTGACAAAACCTCACAC ATGCCACCG	329
FcCSV9tail	AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCC C	330
FcCSV9-R	GGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	331
FcCSV9-F2	CAGAAATTTGTGCTCAAAACCCCCAAGTCTGACAAAACCTCACACATGC CC	332

FcCSV 9tail2	CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAT GAGATCCGGCTGCTAACAAAG	333
FcCSV 9-R2	CTTTGTTAGCAGCCGGATCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG	334

Las reacciones de PCR se realizaron usando los parámetros de ciclos térmicos recomendados, y los fragmentos amplificados por PCR se verificaron mediante electroforesis en gel. Las secuencias se confirmaron realizando alineamientos con las secuencias teóricas usando los algoritmos de alineamiento por pares EMBOSS. Las 5 secuencias de ADN y proteínas clonadas de Fc-HRS(2-60) y HRS(1-60)-Fc se muestran a continuación.

Secuencia de ADN de Fc-HRS(2-60) (fusión de Fc N-terminal):

ATGTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC
GTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA
CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGTCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAG
CTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCG
AGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTCTGAT

10 GAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAAACCCCCAAG TGA (SEQ ID NO:335)

Secuencia de ADN de HRS(1-60)-Fc (fusión de Fc C-terminal).

ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAG
GCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAACTCCT
GAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCCTGATGAAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAAACCCC
CAAGTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC
CGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
TACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA
ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC
TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCG
ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCC
TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACC
ACTACACGCAGAAGAGC CTC TCC CTG TCT CCG GGTAATGA (SEQ ID NO:336)

Secuencia de proteína de Fc-HRS(2-60) (fusión de Fc N-terminal)

MSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAERAALAEELVKLQGERVR
GLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPK (SEQ ID NO:337)

5 Secuencia de proteínas de HRS(1-60)-Fc (fusión de Fc C-terminal)

MAERAALAEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:338)

Se prepararon construcciones de ADN adicionales de Fc-histidil ARNt sintetasa (HRS-Fc) N-terminal y C-terminal de la siguiente manera.

10

Construcción de plásmidos. HRS(2-60) con una Fc N-terminal o HRS (1-60) con una Fc C-terminal (ejemplo 8) se subclonaron en un vector pET24b modificado (EMD, Gibbstown, NJ) que contenía un promotor TAC en lugar de T7 («pET24b_TAC»). Fc-HRS(2-60) y HRS(1-60)-Fc se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores a continuación que contienen un sitio NdeI 5' y un sitio XhoI 3', y el ADN amplificado

15

resultante se subclonó en pET24b_TAC usando los sitios de restricción de NdeI y XhoI.

Se usaron los siguientes cebadores para amplificar Fc-HRS(2-60) (fusión de Fc N-terminal) (**tabla E11**):

Tabla E11 Secuencias de cebadores

Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
1921-NdeI-DIR	GATATACATATGTCTGACAAAACCTCACACATGCC	343
1921-XhoI-INV	GATCCTCGAGTCACTTGGGGGTTTTG	344

Se usaron los siguientes cebadores para amplificar HRS (1-60)-Fc (fusión de Fc C-terminal) (tabla E12).

Tabla E12 Secuencias de cebadores		
Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
1922-NdeI-DIR	GATATACATATGGCAGAGCGTGCGG	345
1922-XhoI-INV	GATCCTCGAGTCATTTACCCGGAGAC	346

Las reacciones de PCR se realizaron usando los parámetros de ciclos térmicos recomendados y los fragmentos 5 amplificados por PCR se verificaron mediante electroforesis en gel. Las secuencias se confirmaron realizando alineamientos con las secuencias teóricas usando DNASTAR Lasergene SeqMan Pro. Las secuencias de ADN y proteínas clonadas de Fc-HRS(2-60) y HRS(1-60)-Fc se muestran a continuación.

Secuencia de ADN de Fc-HRS(2-60) (fusión de Fc N-terminal):

10

ATGTCTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC
GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACATGCGTGTTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT
ACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA
CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAG
CTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCG
AGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTTGAT
GAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAAACCCCCAAG tga (SEQ ID NO:347)

Secuencia de ADN de HRS(1-60)-Fc (fusión de Fc C-terminal):

ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAG
GCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAACTCCT
GAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAAACCC
CCAAGTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA
CCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGC
CTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAAC
CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA tga (SEQ ID NO:348)

Secuencia de proteína de Fc-HRS(2-60) (fusión de Fc N-terminal):

MSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGKAERAALAEELVKLQGERVR
GLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPK. (SEQ ID NO:349)

5 Secuencia de proteínas de HRS(1-60)-Fc (fusión de Fc C-terminal):

MAERAALAEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKS
DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:350)

Se prepararon construcciones de ADN adicionales de Fc-histidil ARNt sintetasa (HRS-Fc) N-terminal y C-terminal como se indica a continuación.

10

Construcción de plásmidos. HRS (2-40), (2-45), (2-50), (2-55), (2-66) con una Fc N-terminal o HRS (1-40), (1-45), (1-50), (1-55), (1-66) con una Fc C-terminal se generaron usando Quikchange Mutagenesis (Agilent, Santa Clara, CA). Las construcciones pET24b_TAC generadas anteriormente que contenían Fc-HRS (2-60) y HRS (1-60)-Fc en combinación con los cebadores enumerados a continuación, se usaron en la reacción de Quikchange para generar

15 las construcciones de HRS-Fc.

Se usaron los siguientes cebadores para amplificar los polipéptidos Fc-HRS (2-40), (2-45), (2-50), (2-55), (2-66) (fusión de Fc N-terminal) (**tabla E13**):

Tabla E13
Secuencias de cebadores

Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
Fc-H-aa2-40 DIR	5'- GGT GGC GAA ACT CCT GAA ATG ACT CGA GGA TCC GGC TGC -3'	351
Fc-H-aa2-40 INV	5'- GCA GCC GGA TCC TCG AGT CAT TTC AGG AGT TTC GCC ACC -3'	352
Fc-H-aa2-45 DIR	5'- CTG AAG GCA CAG CTG TGA CTC GAG GAT CCG GCT GC -3'	353
Fc-H-aa2-45 INV	5'- GCA GCC GGA TCC TCG AGT CAC AGC TGT GCC TTC AG -3'	354
Fc-H-aa2-50 DIR	5'-GGG TCC TGA TGA AAG CTG ACT CGA GGA TCC GGC TGC -3'	355
Fc-H-aa2-50 INV	5'- GCA GCC GGA TCC TCG AGT CAG CTT TCA TCA GGA CCC -3'	356
Fc-H-aa2-55 DIR	5'- GCA AAC AGA AAT TTG TGT GAC TCG AGG ATC CGG CTG C -3'	357
Fc-H-aa2-55 INV	5'- GCA GCC GGA TCC TCG AGT CAC ACA AAT TTC TGT TTG C -3'	358
Fc-H-add-aa61-66 DIR	5'- GCT CAA AAC CCC CAA GGG AAC CCG TGA TTA TAG TTG ACT CGA GGA TCC GG -3'	359
Fc-H-add-aa61-66 INV	5'- CCG GAT CCT CGA GTC AAC TAT AAT CAC GGG TTC CCT TGG GGG TTT TGA GC -3'	360

Se usaron los siguientes cebadores para amplificar HRS (1-40), (1-45), (1-50), (1-55), (1-66)-Fc (fusión de Fc C-terminal): (**tabla E14**).

Tabla E14 Secuencias de cebadores		
Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
H-aa1-40-Fc DIR	5'- GGT GGC GAA ACT CCT GAA ATC TGA CAA AAC TCA CAC ATG C -3'	361
H-aa1-40-Fc INV	5'- GCA TGT GTG AGT TTT GTC AGA TTT CAG GAG TTT CGC CAC C -3'	362
H-aa1-45-Fc DIR	5'- CTG AAA CTG AAG GCA CAG CTG TCT GAC AAA ACT CAC ACA TGC -3'	363
H-aa1-45-Fc INV	5'- GCA TGT GTG AGT TTT GTC AGA CAG CTG TGC CTT CAG TTT CAG -3'	364
H-aa1-50-Fc DIR	5'- GCT GGG TCC TGA TGA AAG CTC TGA CAA AAC TCA CAC ATG C -3'	365
H-aa1-50-Fc INV	5'- GCA TGT GTG AGT TTT GTC AGA GCT TTC ATC AGG ACC CAG C -3'	366
H-aa1-55-Fc DIR	5'- GAA AGC AAA CAG AAA TTT GTG TCT GAC AAA ACT CAC ACA TGC -3'	367
H-aa1-55-Fc INV	5'- GCA TGT GTG AGT TTT GTC AGA CAC AAA TTT CTG TTT GCT TTC -3'	368
H-add-aa61-66-Fc DIR	5'- GCT CAA AAC CCC CAA GGG AAC CCG TGA TTA TAG TTC TGA CAA AAC TCA C -3'	369
H-add-aa61-66-Fc INV	5'- GTG AGT TTT GTC AGA ACT ATA ATC ACG GGT TCC CTT GGG GGT TTT GAG C -3'	370

Las reacciones de PCR se realizaron usando los parámetros de ciclos térmicos recomendados por el fabricante. Las secuencias se confirmaron realizando alineamientos con las secuencias teóricas usando DNASTAR Lasergene SeqMan Pro. Las secuencias de ADN y proteínas clonadas de las construcciones de HRS-Fc se muestran a continuación.

Secuencia de ADN de Fc-HRS (2-40) (fusión de Fc N-terminal):

ATGTCTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG
GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGCGTGCGGCGCTG
GAGGAGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCA
GCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAATGA (SEQ ID NO:371)

10 Secuencia de ADN de Fc-HRS (2-45) (fusión de Fc N-terminal):

ATGTCTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG
GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGCGTGCGGCGCTG
GAGGAGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCA
GCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGTGA
(SEQ ID NO:372)

Secuencia de ADN de Fc-HRS (2-50) (fusión de Fc N-terminal):

ATGTCTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
 GACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
 CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
 ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
 GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
 ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG
 GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC
 GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
 GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGCGTGCGGCGCTG
 GAGGAGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCA
 GCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGT
 CCTGATGAAAGCTGA (SEQ ID NO:373)

Secuencia de ADN de Fc-HRS (2-55) (fusión de Fc N-terminal):

ATGTCTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
 GACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
 CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
 ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
 GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
 ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG
 GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC
 GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
 GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGCGTGCGGCGCTG
 GAGGAGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCA
 GCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGT

5 CCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGTGA (SEQ ID NO:374)

Secuencia de ADN de Fc-HRS (2-66) (fusión de Fc N-terminal):

ATGTCTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG
GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGCGTGCGGCGCTG
GAGGAGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCA
GCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGT
CCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAAACCCCCAAGGGAACCCGTGATTATAG
TTGA (SEQ ID NO:375)

Secuencia de ADN de HRS(1-40)-Fc (fusión de Fc C-terminal):

ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTG
CGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAAC
TCCTGAAATCTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG
GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG
GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:376)

- 5 Secuencia de ADN de HRS(1-45)-Fc (fusión de Fc C-terminal):

ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAG
GCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAACTCCT
GAAACTGAAGGCACAGCTGTCTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG
AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGA
TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG
ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT
GCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ
ID NO:377)

Secuencia de ADN de HRS(1-50)-Fc (fusión de Fc C-terminal):

ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAG
GCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAACTCCT
GAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCTCTGACAAAACCTCACACATGCCCAC
CGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCA
AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA
CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG
CTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC

5 GGGTAAATGA (SEQ ID NO:378)

Secuencia de ADN de HRS(1-55)-Fc (fusión de Fc C-terminal):

ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAG
GCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAACTCCT
GAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGTCTGACAAAA
CTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT
TCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG
GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG
TGGTGAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA
ACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 379)

Secuencia de ADN de HRS(1-66)-Fc (fusión de Fc C-terminal):

ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAG
GCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAACTCCT
GAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGTCTAAAACCC
CCAAGGGAACCCGTGATTATAGTTCTGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCA
CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC
CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGC
CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA
CCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC
ACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

(SEQ ID NO:380)

5 Secuencia de proteína de Fc-HRS (2-40) (fusión de Fc N-terminal):

MSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAERAALAEELVKLQGERVR
GLKQQKASAELIEEEVAKLLK (SEQ ID NO:381)

Secuencia de proteína de Fc-HRS (2-45) (fusión de Fc N-terminal):

MSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAERAALAEELVKLQGERVR
GLKQQKASAELIEEEVAKLLKLAQL (SEQ ID NO:382)

5 Secuencia de proteína de Fc-HRS (2-50) (fusión de Fc N-terminal):

MSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAERAALAEELVKLQGERVR
GLKQQKASAELIEEEVAKLLKLAQLGPDES (SEQ ID NO:383)

Secuencia de proteína de Fc-HRS (2-55) (fusión de Fc N-terminal):

MSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAERAALAEELVKLQGERVR

10 GLKQQKASAELIEEEVAKLLKLAQLGPDESKQKFV (SEQ ID NO:384)

Secuencia de proteína de Fc-HRS (2-66) (fusión de Fc N-terminal):

MSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAERAALAEELVKLQGERVR
GLKQQKASAELIEEEVAKLLKLAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS (SEQ ID NO:385)

Secuencia de proteínas de HRS(1-40)-Fc (fusión de Fc C-terminal):

15

MAERAALAEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:386)

Secuencia de proteínas de HRS(1-45)-Fc (fusión de Fc C-terminal):

MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLSDKTHTCPPCPAP ELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:387)

Secuencia de proteínas de HRS(1-50)-Fc (fusión de Fc C-terminal):

MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLGPDESSDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW

5 QQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:388)

Secuencia de proteínas de HRS(1-55)-Fc (fusión de Fc C-terminal):

MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVSDKTHT
CPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:389)

Secuencia de proteínas de HRS(1-66)-Fc (fusión de Fc C-terminal):

10 MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKG
TRDYSSDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:390)

La construcción de ADN de fusión en tándem Fc-histidil ARNt sintetasa (HRS-Fc) N-terminal se preparó de la siguiente manera.

15 **Construcción de plásmidos.** HRS (2-60)_HRS (2-60) con una Fc N-terminal se generó usando la construcción pET24b_TAC_Fc-HRS (2-60). El gen HRS(2-60) se amplificó por PCR con los cebadores enumerados a continuación, que contienen un sitio de XhoI 5' y 3'. Las reacciones de PCR se realizaron usando los parámetros de ciclado térmico recomendados. La construcción pET24b_TAC_Fc-HRS (2-60) se digirió con XhoI, se desfosforiló y
20 se purificó en gel. El fragmento generado por PCR también se digirió con XhoI y se purificó en gel. El HRS purificado en gel (2-60) se subclonó en el sitio XhoI de pET24b_TAC_Fc-HRS (2-60). Para generar la construcción final, se usó la mutagenia QuikChange para eliminar el codón de parada y el sitio XhoI entre los fragmentos de HRS (2-60) en tándem usando los cebadores que se enumeran a continuación. Las secuencias se confirmaron realizando alineamientos con las secuencias teóricas usando DNASTAR Lasergene SeqMan Pro.

25 Se usaron los siguientes cebadores para amplificar Fc-HRS (2-60) (tabla E15):

Tabla E15 Secuencias de cebadores		
Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
XhoI-H-aa2-60 DIR	5'-TAT TCT CGA GGC AGA GCG TGC GGC -3'	391
H-aa2-60-stop-XhoI INV	5'-GCGCCTCGAGTCACTTGGGGGTTTTG - 3'	392
eliminar el concatámero	5'- GTG CTC AAA ACC CCC AAG GCA GAG CGT GCG GCG	393

terminación-XhoI DIR	CTG G -3	
eliminar el concatámero terminación-XhoI INV	5'- CCA GCG CCG CAC GCT CTG CCT TGG GGG TTT TGA GCA C -3'	394

Secuencia de ADN de Fc-HRS(2-60) HRS(2-60) (fusión de Fc N-terminal):

ATGTCTGACAAAACCTCACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC
GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA
CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAG
CTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCG
AGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAACTCCTGAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTCTGAT
GAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAAACCCCCAAGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGG
AGCTGGTGAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGC
CGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAACTCCTGAACTGAAGGCACAGCTGGGTCTCTG

5 ATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAAACCCCCAAGTGA (SEQ ID NO:395)

Secuencia de proteína de Fc-HRS(2-60) HRS(2-60) (fusión de Fc N-terminal):

MSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAERAALAEELVKLQGERVR
GLKQKQKASAELEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKAERAALAEELVKLQGERVRGL
KQKQKASAELEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPK (SEQ ID NO:396)

- Preparación y purificación de proteínas de fusión HRS(1-60)-Fc y Fc-HRS(2-60). **Cepa de *E. coli*.** Las células competentes de *E. coli* BL21-CodonPlus® (DE3) RIPL (Agilent 230280) transformadas con las construcciones de expresión pET descritas anteriormente se usaron para la producción inicial de proteínas de fusión de Fc.

- Medios.** El medio M9YE se preparó mezclando sal mínima 5X M9 estéril (BD 248510), solución de extracto de levadura en agua purificada estéril (BD 212750), glucosa al 20 % esterilizada (Sigma G7021) y MgSO₄ 1,0 M estéril (Sigma M7506). Para la solución de alimentación, la solución de extracto de levadura (5 %), solución de glucosa (50 %) y 10 ml de solución de oligoelemento concentrado (que contenía Fe³⁺, Mn²⁺, ácido bórico, Mo⁶⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ y EDTA), así como 10 ml de solución de sulfato de magnesio, se autoclavarón por separado. Los componentes se mezclaron justo antes de la fase de lote alimentado. Se añadió sulfato de kanamicina a una concentración final de 100 µg/ml en el medio de cultivo.

20

Fermentación por lotes alimentados. Se usó un fermentador Multifors (HT-Infors) de 0,5 l con el software Iris para el proceso de fermentación por lotes alimentados. La agitación se ajustó a 1000 rpm. El valor del pH se controló automáticamente a 7,0 mediante la adición de un 30 % de hidróxido de amonio (Sigma 221228) y un 30 % de ácido fosfórico (Sigma P5811). Se proporcionó aire a un caudal de 0,5 l/min con un compresor de aire de diafragma sin aceite (Cole-Parmer) y se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 µm. El nivel de oxígeno disuelto se controló al 70 % proporcionando oxígeno puro (West Air). La temperatura se controló a 30 °C con un circulador Neslab RTE7 (Thermo Scientific). La formación de espuma se controló mediante la adición del antiespumante 204 (Sigma A8311).

El volumen inicial de medio M9YE en el fermentador fue 0,3 l. El fermentador se inoculó con 15 ml del cultivo de siembra que se hizo crecer durante una noche a 30 °C y 250 rpm. Cuando la fuente de carbono se agotó en el recipiente, la solución de alimentación concentrada se introdujo en el recipiente mediante una bomba peristáltica a 0,12 ml/min. Cuando la densidad óptica de las células a 600 nm alcanzó la fase exponencial, el cultivo se indujo con IPTG 0,5 mM (Fisher Scientific BP1755). El cultivo se hizo crecer durante una noche (aproximadamente 17 horas de inducción) y la DO₆₀₀ final alcanzó aproximadamente 120. Las células se recogieron mediante centrifugación a 8.000 g durante 30 min. El sobrenadante se decantó y el sedimento se almacenó a -20 °C hasta la purificación.

Se prepararon proteínas de fusión HRS-Fc adicionales usando un vector pET24b modificado (EMD, Gibbstown, NJ) que contenía un promotor TAC en lugar de T7 («pET24b_TAC») y se transformaron en células competentes UT5600. Se prepararon células competentes UT5600 a partir de material bacteriano obtenido del Coli Genetic Stock Center (CGSC, Yale). UT5600 es una cepa derivada de K12 de *E. coli* y se designa como genotipo: *F*, *araC14*, *leuB6* (*Am*), *secA206* (*aziR*), *lacY1*, *proC14*, *tsx-67*, Δ (*ompT-fepC*) 266, *entA403*, *glnX44* (*AS*), λ , *trpE38*, *rfbC1*, *rpsL109* (*strR*), *xylA5*, *mtl-1*, *thiE1*.

Los vectores de expresión que comprenden estas construcciones se transformaron en células UT5600 usando procedimientos estándar y se prepararon reservas de glicerol.

Medio de fermentación. El medio UT5600_M9_YE se preparó mezclando, para los medios por lotes: 16 gramos/l de extracto de Levadura (Difco 212750), 8 g/l de glicerol (Sigma G2025), 11,28 g/l de Sales M9 (Difco 248510) y 100 µl/l de Antifoam 204 (Sigma AG6426) con agua desionizada y esterilizando mediante autoclave. Las adiciones posteriores al autoclave fueron de 0,64 ml/l de solución de metales traza, 2,3 ml/l de sulfato de magnesio 100x y 45,83 g/l de leucina. Los medios de alimentación se prepararon mezclando 250 g/l de extracto de levadura, 225 g/l de glicerol y 100 µl/l de antiespumante 204 en agua desionizada y se esterilizaron mediante autoclave. Las adiciones posteriores a la esterilización fueron 10 ml/l de solución de metales traza, 2,3 ml/l de sulfato de magnesio 100x, 45,83 ml/l de L-leucina.

Fermentación por lotes alimentados. Se utilizó un fermentador de 0,5 l (Infors) con el software MFCS/DA para la fermentación por lotes alimentados. La agitación se ajustó en cascada a 500-1200 rpm. El valor del pH se controló a 7,0 ± 0,1 automáticamente mediante la adición de un 30 % de hidróxido de amonio (Sigma 221228) y un 30 % de ácido fosfórico (Sigma P5811). El aire se proporcionó a un caudal de 0,5 l/min con un compresor de aire de diafragma sin aceite (Cole-Parmer). El aire se hizo pasar a través de un filtro Midisart 2000 de 0,2 µm (Sartorius 17805). El oxígeno puro (West Air) se suministró automáticamente para controlar el nivel de oxígeno disuelto al 30 %. La temperatura se controló a 30 °C con un circulador Neslab RTE7 (Thermo Scientific). La formación de espuma se controló mediante la adición del antiespumante 204 (Sigma A8311) de acuerdo con fuera necesario. El volumen inicial de medio UT5600_M9_YE en el fermentador fue de 0,24 l. El fermentador se inoculó con ≈10 Unidades de DO (aproximadamente 1-2 ml de siembra a una DO de 5-10) del cultivo de siembra que se hizo crecer durante 6 horas a 37 °C y 250 rpm. Cuando el lote de glicerol se agotó en el recipiente (aproximadamente 4 horas), la solución de alimentación concentrada se introdujo en el recipiente mediante una bomba peristáltica ajustada en un programa de alimentación exponencial. Cuando la densidad óptica de las células a 600 nm alcanzó aproximadamente 150, se indujo el cultivo con IPTG 0,5 mM (Fisher Scientific BP1755). El cultivo se incubó 4 horas después de la inducción y se recogió mediante centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos. El rendimiento aproximado del sedimento celular final fue de 150-200 gramos por litro de peso celular húmedo (WCW). El sedimento celular se almacenó a -80 °C hasta la purificación. La expresión de la proteína diana se confirmó a través de SDS-PAGE y transferencia de Western para IgG antihumana de cabra, anticuerpo conjugado con HRP (Thermo p/n 31413).

Purificación de proteínas de fusión de FC. Los sedimentos celulares congelados se resuspendieron en 4 volúmenes (es decir, 4 ml/g de sedimento celular) de tampón de lisis (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, β-ME 14 mM, pH 7,5). Se añadieron a la suspensión comprimidos completos de inhibidor de proteasa LIBRE de EDTA (Roche) en una proporción de 1 comprimido/50 ml. La suspensión se hizo pasar a través de un microfluidizador (Microfluidics) dos veces a 14.000 psi con enfriamiento con hielo. El lisado se centrifugó a ≥ 10.000 x g durante 45 minutos a 4 °C. El

sobrenadante se filtró a través de filtros de cápsula de Sartobran de 0,45 + 0,22 µm (Sartorius).

El lisado clarificado se unió a la resina MabSelect (GE Healthcare), se equilibró previamente con tampón de unión (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5) en una proporción de 1 ml de resina por 10 g de pasta celular. La columna se lavó con 500 volúmenes de columna de tampón de unión + 0,1 % de Triton X-114 seguido de 100 volúmenes de columna del tampón de unión. Con la proteína unida, las proteínas de fusión se eluyeron con 3,75 volúmenes de columna de tampón de elución (glicina 0,1 M, arginina 0,5 M, pH 3,0) a un tubo de recogida que contenía 1,25 volúmenes de columna de tampón de neutralización (Tris 1 M, pH 8,0).

10 Opcionalmente, para la eliminación adicional de especies de alto peso molecular, el material se concentró en dispositivos de concentración ultracentrífuga Amicon de 30 kDa (Millipore) y se cargó en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño HiLoad Superdex 200 pg 16/600 (GE Healthcare). El material se eluyó en 1,1 volúmenes de columna de 1X PBS pH 7,4 (Gibco n.º 10010), y se agruparon las fracciones correspondientes al pico principal basándose en el proceso de absorbancia del cromatograma a 280 nm.

15 Si no se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño, las proteínas de fusión Fc purificadas se intercambiaron en un tampón que contenía PBS, a pH 7,4. La proteína dializada se hizo pasar a través de un filtro de membrana Q (Sartobind-Q de Sartorius o Mustang-Q de Pall) o una columna de Q-Sepharose (GE Healthcare) para la eliminación adicional de endotoxinas, y se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm.

20 **Proceso de purificación escalable para proteínas de fusión FC.** El proceso de purificación con MabSelect seguido de cromatografía de exclusión por tamaño se usó para purificar múltiples proteínas de fusión Fc usando un proceso robusto, efectivo con un desarrollo de purificación mínimo. Sin embargo, el uso de lavado con detergente durante la una etapa de cromatografía de Proteína A (MabSelect) y de exclusión por tamaño limita la capacidad de
25 aumentar la purificación. También se desarrolló un proceso de purificación para el aumento de escala para las proteínas de fusión de Fc utilizando floculación de lisado, cromatografía de proteína A, intercambio de cationes (CEX) y cromatografía de hidroxiapatita cerámica (CHT).

La resuspensión y la lisis se realizaron como se ha descrito anteriormente, con la omisión de las tablas de
30 inhibidores de proteasa y β-ME del tampón de lisis. Después de la lisis, el lisado se floculó con la adición de polietilenimina, pm 1300 (Sigma Aldrich) a 0,04 % (v/v) y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. La centrifugación y la clarificación se realizaron como se ha descrito anteriormente. La cromatografía de Proteína A se realizó en un lisado clarificado usando resina MabSelect en una columna de cromatografía rellena a una proporción de carga de 1 ml de resina por 4 g de pasta celular, con una etapa de lavado de 5 volúmenes de columna en Tris 50 mM, NaCl 500 mM
35 pH 7,5, seguida de elución en 3 volúmenes de columna de glicina 0,1 M pH 3,0 y neutralización en 0,3 volúmenes de columna de Tris 1 M pH 8,0. Después de la Proteína A, se preparó la carga de CEX mediante dilución 5x del eluyente post-Proteína A en el tampón de equilibrio de CEX (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,0), se cargó en una columna de alto rendimiento SP Sepharose, se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrio, y se eluyó en un gradiente de cloruro de sodio lineal de 0 a 300 mM de NaCl en 10 volúmenes de columna. Las
40 fracciones de CEX se agruparon basándose en el análisis SDS-PAGE de las fracciones de pico de elución. La hidroxiapatita cerámica se realizó en el grupo CEX cargando en una columna CHT Tipo I de 40 kDa µm (Bio-Rad) equilibrada en tampón de equilibrio de CHT (5 mM de fosfato de sodio, 150 mM de cloruro de sodio, 1 µM de cloruro de calcio pH 6,5), se lavó con 5 columnas de tampón de equilibrio y se eluyó en un gradiente de cloruro de sodio lineal de 150 mM a cloruro de sodio 1,5 M en 10 volúmenes de columna y un NaCl 1,5 M se mantuvo hasta 20
45 volúmenes de columna para completar la elución. Después de CHT, la proteína se intercambió con tampón en PBS 1X pH 7,4 usando dispositivos de concentración centrífuga Amicon de 30 kDa (Millipore).

La concentración de proteína de fusión se determinó mediante el ensayo de proteínas de Bradford (Thermo Scientific) o mediante absorbancia UV a 280 nm. La concentración de proteína de fusión se determinó mediante el
50 ensayo de proteína de Bradford (Thermo Scientific). El nivel de endotoxinas estaba por debajo de 4 UE/mg de acuerdo con lo determinado por el ensayo EndoSafe PTS LAL (Charles River).

Análisis de proteínas de fusión HRS-Fc. Las proteínas de fusión HRS-Fc purificadas se analizaron mediante SDS-PAGE como se muestra en la **figura 21**. Las muestras de 10 µg de carga proteica se procesaron en geles Bis-Tris
55 NuPAGE 4-12 %, 150 V durante 60 minutos en tampón MOPS-SDS y se tiñeron con Instant Blue. Las muestras reducidas tenían DTT 25 mM, y se calentaron a 95 °C durante 10 minutos en tampón LDS 1X antes de la carga.

Las proteínas de fusión HRS-Fc purificadas también se analizaron mediante un procedimiento de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Las muestras se cargaron en una columna aTSK-Gel Super SW3000 (TOSOH, 4,6 mm

de diámetro x 30 cm, 4 µm) en un sistema de HPLC Agilent 1260. Se llevó a cabo una prueba isocrática de 30 minutos a 0,3 ml/min con una fase móvil que contenía NaCl 0,1 M, fosfato de Na 0,2 M y 5 % de 2-propanol a pH 7. La detección por UV se realizó a 280 nm. El cromatograma se muestra en la **figura 22**.

- 5 Aproximadamente el 83 % de la proteína está en la forma de dímero deseado, después de la proteína A y antes de la purificación por cromatografía de exclusión de tamaño, con la cantidad restante presente como especie de alto peso molecular. Después de la cromatografía de exclusión por tamaño, la proporción de dímero aumenta del 95 al 99 %. Usando el proceso de purificación de Proteína A, intercambio catiónico e hidroxipatita, la proporción de dímero es mayor al 99 %. La mayor parte de la proteína dímera contiene el enlace disulfuro intercatenario en la
- 10 región bisagra Fc, mientras que también existe un dímero no covalente.

El análisis de los datos de espectros de masas intactos obtenidos usando LC/ESI-MS demuestra que el tamaño molecular de las proteínas de fusión FC en condiciones no reductoras es consecuente con la masa molecular esperada de aproximadamente 64.520 daltons (datos no mostrados). Los espectros de CD de las proteínas de

15 fusión Fc en las regiones UV lejana y cercana revelan que la estructura de las proteínas de fusión es consecuente con las estructuras de dominio esperadas. Adicionalmente, los datos de calorimetría diferencial de barrido decovolucionados obtenidos de las proteínas de fusión HRS-Fc demuestran que las proteínas de fusión Fc están plegadas con dos transiciones térmicas principales características de los dominios CH1 y CH2 del componente Fc (datos no mostrados), compatibles con las estructuras predichas.

20 Para evaluar las características farmacocinéticas de las construcciones de proteínas de fusión HRS-Fc en comparación con las proteínas HRS no modificadas, se administraron proteínas a ratones C57BL/6 normales a través de una única embolada intravenosa o subcutánea en una dosis de 8 mg/kg. Se tomaron muestras de sangre en serie con los tiempos de muestreo distribuidos en nueve animales por forma de producto. Para cada punto

25 temporal, se extrajeron los sueros de tres ratones independientes. Las concentraciones del artículo de prueba se midieron mediante ELISA y los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron usando un análisis no compartimental en el software Phoenix.

Los resultados, que se muestran en las **figuras 23A, 23B y 23C** demuestran que la creación de las proteínas de

30 fusión Fc dio como resultado una semivida, exposición y biodisponibilidad SC significativamente mejoradas

Tabla E16							
Análisis farmacocinético de proteínas de fusión HRS-Fc							
Forma de producto	vía	V_d¹ (ml/kg)	CL² (ml/h/kg)	Semivida (h)	Biodisponibilidad³ (%)	AUC⁴ (h*nM)	Aumento de veces en la exposición⁵
HRS(1-60)	IV	119	574	0,5	--	1.835	--
Fc-HRS(2-60)	IV	176	2,8	72	--	89.916	209
HRS(1-60)-Fc	IV	127	5,1	33	--	49,364	115
HRS(1-60)	SC	1.457	1.541	0,7	37	683	
Fc-HRS(2-60)	SC	452	4,4	71	63	56.307	352
HRS(1-60)-Fc	SC	537	10,2	37	50	24.623	154
¹ Volumen de distribución en situación de equilibrio para administración IV o fase terminal para administración SC							
² Aclaramiento para administración IV o en función de la biodisponibilidad para administración SC							
³ Comparado con la misma forma de producto administrado IV							
⁴ Área bajo la curva desde el momento de la dosis predicha hasta el infinito							
⁵ Aumento de veces en la exposición molar en comparación con la proteína no modificada administrada en la misma vía							

El análisis farmacocinético mostrado en la **tabla E16** demuestra que las construcciones de fusión HRS-Fc exhiben una exposición, aclaramiento y semivida sistémicas significativamente mejoradas en comparación con las proteínas

35 no modificadas. La creación de las proteínas de fusión Fc también mejoró la biodisponibilidad subcutánea de las proteínas en comparación con las proteínas no modificadas. En particular, Fc-HRS(1-60) aumentó la exposición en comparación con la proteína no modificada de 200 a 300 veces, dependiendo de la vía de administración, además, la biodisponibilidad SC y la semivida aumentaron significativamente.

40 EJEMPLO 9

PRUEBAS DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN FC EN COLITIS INDUCIDA POR TNBS

El intestino grueso está recubierto por una mucosa epitelial que está invaginada en estructuras similares a un matraz, las criptas. A diferencia del intestino delgado, no hay vellosidades en esta región, con la parte superior de las criptas abriéndose en una región de mesa plana. Las células de la cripta son generadas por células madre ubicadas en la base de la cripta, cuyas células hijas se dividen rápidamente y se diferencian en colonocitos predominantes y células caliciformes que producen mucina (también se produce un número menor de células endocrinas y células M). El tamaño de la cripta y el número de células caliciformes por cripta aumentan a lo largo del intestino grueso desde el ciego hasta el recto, presumiblemente para ayudar al paso de las heces y proporcionar suficiente protección de las células madre y de la mucosa a medida que el agua es absorbida por las heces.

Normalmente, la tasa de producción de células en la cripta intestinal se ajusta de manera precisa a la tasa de pérdida de células - opera un mecanismo homeostático muy sensible. La ruptura de la barrera mucosa permite la entrada de bacterias en el cuerpo, con implicaciones de enfermedades resultantes. A la inversa, la hiperplasia puede generar pólipos y finalmente tumores. La ruptura de la barrera intestinal puede ser causada por la exposición a agentes citotóxicos no específicos del tipo celular (a menudo específicos de la proliferación) - típicamente terapias contra el cáncer. Sin embargo, la perturbación del recambio de células epiteliales también es una característica común de las enfermedades inflamatorias.

Los modelos actuales de roedores de la enfermedad intestinal inflamatoria (EII) incluyen, por ejemplo, modelos generados al desencadenar una enfermedad autoinmunitaria mediante la manipulación de la población de linfocitos T, que irritan el revestimiento mucoso del intestino por la acumulación de material particulado en el intestino grueso (como con DSS, sulfato sódico de dextrano), o ruptura química del epitelio (como con el sulfonato de trinitrobenzeno, TNBS).

En cualquiera de estos modelos, la gravedad de la enfermedad puede evaluarse mediante una variedad de evaluaciones subjetivas de los grados patológicos observados, así como medidas más objetivas y cuantitativas del daño, para proporcionar información más significativa sobre la biología subyacente. Es posible ampliar el análisis usando medidas de longitud/área asistidas por ordenador para mapear los cambios en la mucosa/submucosa y obtener más medidas cuantitativas del daño, y por lo tanto, la eficacia terapéutica. Aunque cada uno de estos modelos presenta diferentes ventajas y desventajas, el modelo de colitis por TNBS es un modelo establecido de diversos aspectos de la enfermedad intestinal inflamatoria en seres humanos, que se ha usado con éxito para validar y optimizar la eficacia de los productos terapéuticos humanos.

Modelo en ratón de TNBS. En este modelo de colitis, la irritación del colon se induce por la administración intracolónica de TNBS en etanol. Esto provoca una colitis aguda que tiene un perfil de citocinas tipo TH1, que se caracteriza por la expresión de genes que codifican TNF- α , IFN- γ e IL-12 entre otros (Fichtner-Feigl y col, J. Clin. Invest. 2005. 115: 3057-3071). La colitis puede ser grave y localizada en el área del colon donde se introduce el TNBS. La respuesta inflamatoria da como resultado hinchazón localizada, infiltración de células inflamatorias y pérdida epitelial.

En este estudio, la eficacia del polipéptido de HRS no modificado, (HRS(1-60)), se comparó con las proteínas de fusión Fc-HRS(2-60) y HRS(1-60)-Fc para evaluar su eficacia en mejorar la colitis aguda inducida por TNBS en ratones. Se evaluaron tres regímenes de dosificación diferentes, que emplean la administración iv o sc del elemento de prueba. Se utilizó budesonida (p.o.) como elemento de referencia para el estudio.

Animales y enjaulado: en el estudio se usaron un total de 100 ratones macho BDF-1 (libres de H.pylori, libres de norovirus murino) (Harlan Laboratories, Reino Unido). Los animales tenían 8-10 semanas de edad en el suministro y se usaron a las 10-12 semanas de edad. Todos los ratones se mantuvieron en jaulas ventiladas individualmente (IVC) en una unidad de barrera SPF (libre de patógenos específicos). Los animales fueron identificados por jaulas numeradas y punciones auriculares.

Dieta y bienestar animal: los animales fueron alimentados con dieta expandida de rata y ratón de B & K. El agua se suministró en bolsas de agua HYDROPAC™ (agua RO filtrada; productos de Hydropac/lab, Delaware, EE. UU.). Tanto el alimento como el agua estaban disponibles ad libitum. Había una temperatura ambiente constante de 21 ± 2 °C y una humedad relativa media de 55 ± 10 %. El ciclo día-noche fue constante, con fases de luz y oscuridad de 12 horas cada una (turnos de 07:00 h/19:00 h). La salud animal fue monitorizada diariamente y las jaulas fueron limpiadas a intervalos regulares. Todos los procedimientos fueron certificados de acuerdo con la Ley de Reino Unido (Procedimientos Científicos) de Animales de 1986.

Grupos, dosis, administración y formulaciones: un total de 100 ratones se asignaron al azar a diez grupos de

estudio (tabla E17). Todos los ratones en una jaula recibieron el mismo tratamiento y fueron perforados en la oreja para identificarlos. Las mediciones diarias de peso corporal se utilizaron para calcular el volumen del artículo de prueba o el vehículo administrado a los grupos aplicables.

Tabla E17 Grupos de estudio					
Tratamiento	Dosis del artículo de prueba	Volumen y vía de administración	Frecuencia de dosificación	Duración de la dosificación	Códigos de ratón
Vehículo (PBS) solamente	-	5 ml/kg, i.v.	<i>todos los días</i>	día 0 a día 3	1-6
TNBS/vehículo (PBS)	-	5 ml/kg, i.v.	<i>todos los días</i>	día 0 a día 3	7-18
TNBS + budesonida	-	5 ml/kg, i.v.	<i>todos los días</i>	día 0 a día 3	19-28
TNBS + HRS(1-60)	1 mg/kg	5 ml/kg, i.v.	<i>todos los días</i>	día 0 a día 3	29-40
TNBS + Fc-HRS(2-60)	5 mg/kg	5 ml/kg, i.v.	<i>todos los días</i>	día 0 a día 3	41-50
TNBS + Fc-HRS(2-60)	5 mg/kg	5 ml/kg, i.v.	solo una vez	día 0	51-60
TNBS + Fc-HRS(2-60)	15 mg/kg	5 ml/kg, s.c.	<i>todos los días</i>	día 0 a día 3	61-70
TNBS + HRS(1-60)-Fc	5 mg/kg	5 ml/kg, i.v.	<i>todos los días</i>	día 0 a día 3	71-80
TNBS + HRS(1-60)-Fc	5 mg/kg	5 ml/kg, i.v.	solo una vez	día 0	81-90
TNBS + HRS(1-60)-Fc	15 mg/kg	5 ml/kg, s.c.	<i>todos los días</i>	día 0 a día 3	91-100

5

Preparación y administración de TNBS y artículos de prueba. **TNBS:** TNBS (Sigma; n.º de lote SLBD6811V) se preparó como una solución de 15 mg/ml en solución salina/50 % de etanol. Se instiló una dosis única de 200 µl (3 mg de TNBS) en el colon, usando un catéter de plástico, colocado a 4 cm proximal al borde anal, a las 11:00 horas del día de estudio 0. Los animales se mantuvieron en posición invertida durante 1 minuto después de la introducción de TNBS en el colon, para minimizar las fugas del compuesto.

10

HRS (1-60): el artículo de prueba se recibió como cuatro viales de solución madre congelada (0,033 ml de volumen en cada uno) a 17,1 mg/ml, que se almacenaron a -80 °C hasta su uso. En cada día de la administración del artículo de prueba, se tomó una única alícuota y se descongeló en hielo húmedo. Después de descongelar, los contenidos del vial se mezclaron pipeteando arriba y abajo diez veces. Posteriormente, el artículo de prueba se diluyó con vehículo frío (estéril, x 1 PBS, pH 7,4) para dar una solución a 0,2 mg/ml; la solución se mezcló pipeteando arriba y abajo diez veces. Esta solución se administró diariamente (desde el día 0 del estudio hasta el día 3 del estudio) mediante inyección intravenosa, a 5 ml/kg, para dar una dosis de 1 mg/kg.

15

Fc-HRS (2-60): el artículo de prueba se recibió como cuatro viales de solución madre congelada (un vial de 2,51 ml y tres viales de 2,01 ml) a 4,7 mg/ml, que se almacenaron a -80 °C hasta su uso. En cada día de la administración del artículo de prueba, se tomó una única alícuota y se descongeló en hielo húmedo. Después de descongelar, los contenidos del vial se mezclaron pipeteando arriba y abajo diez veces. Posteriormente, el artículo de prueba se diluyó con vehículo frío (estéril, x1 PBS, pH 7,4) para dar soluciones a 3 mg/ml y 1 mg/ml; las soluciones se mezclaron pipeteando arriba y abajo diez veces. Se administró Fc-HRS(2-60) de acuerdo con 3 regímenes diferentes: i) la solución de 1 mg/ml se administró diariamente (desde el día 0 del estudio hasta el día 3 del estudio) mediante inyección intravenosa, a 5 ml/kg, para dar una dosis de 5 mg/kg; ii) la solución de 1 mg/ml se administró diariamente, solo una vez en el día 0 del estudio, mediante inyección intravenosa, a 5 ml/kg, para dar una dosis de 5 mg/kg; iii) la solución de 3 mg/ml se administró diariamente (desde el día 0 del estudio hasta el día 3 del estudio) mediante inyección subcutánea, a 5 ml/kg, para dar una dosis de 15 mg/kg.

20

25

30

HRS (1-60)-Fc: el artículo de prueba se recibió como cuatro viales de solución madre congelada (un vial de 2,37 ml y tres viales de 1,89 ml) a 4,99 mg/ml, que se almacenaron a -80 °C hasta su uso. En cada día de la administración del artículo de prueba, se tomó una única alícuota y se descongeló en hielo húmedo. Después de descongelar, los contenidos del vial se mezclaron pipeteando arriba y abajo diez veces. Posteriormente, el artículo de prueba se diluyó con vehículo frío (estéril, x1 PBS, pH 7,4) para dar soluciones a 3 mg/ml y 1 mg/ml; las soluciones se mezclaron pipeteando arriba y abajo diez veces. Se administró HRS(1-60)-Fc de acuerdo con 3 regímenes diferentes: i) la solución de 1 mg/ml se administró diariamente (desde el día 0 del estudio hasta el día 3 del estudio) mediante inyección intravenosa, a 5 ml/kg, para dar una dosis de 5 mg/kg; ii) la solución de 1 mg/ml se administró diariamente, solo una vez en el día 0 del estudio, mediante inyección intravenosa, a 5 ml/kg, para dar una dosis de 5 mg/kg; iii) la solución de 3 mg/ml se administró diariamente (desde el día 0 del estudio hasta el día 3 del estudio) mediante inyección subcutánea, a 5 ml/kg, para dar una dosis de 15 mg/kg.

35

40

Budesonida: la budesonida se obtuvo de Tocris (Tocris 1101, n.º de lote 1A/128902) y se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso. En cada día de administración, se formuló budesonida como una solución de 1 mg/ml en aceite de cacahuete (Sigma). La budesonida se administró diariamente (desde el día 0 del estudio hasta el día 3 del estudio) mediante sonda oral, a 5 ml/kg, para dar una dosis de 5 mg/kg.

5

Exámenes clínicos y analgesia. Cualquier animal que demostraba una pérdida de peso superior al 15 % se consideraba enfermo y el tratamiento pudo haberse suspendido. Cualquier animal fue sacrificado si la pérdida de peso era superior al 20 %. El bienestar animal fue monitorizado diariamente. Una vez al día, desde el día -1 hasta el final del estudio, todos los ratones fueron pesados y evaluados para determinar la consistencia de las heces y la presencia de sangre manifiesta en las heces o alrededor del ano de acuerdo con los criterios de la tabla E18.

10

Tabla E18 Criterios de puntuación para los parámetros de enfermedades en vida.			
Puntuación	Pérdida de peso (% del peso el día 0)	Observación de las heces	Sangre manifiesta (en las heces/alrededor del ano)
0	<1 %	Normal	Ninguna
1	≥1 % <5 %	Blandas; colon/recto vacíos en la necropsia; ninguna observación en un período de 30 minutos	Ligera
2	>5 % <10 %	No formadas	Moderada
3	>10 % <15 %	Acuosas / de tipo gel	Grave
4	>15 %		

Uso de la analgesia: no se usó analgesia en este estudio, siguiendo las indicaciones el Patrocinador, ya que podría haber interferido con la acción del artículo de prueba.

15

Recolección y preparación de tejido para examen histológico: en el momento del sacrificio, los ratones se anestesiaron con 4 % de isoflurano, con 2 l/min de O₂ y 2 l/min de N₂O. Cuando estaban completamente anestesiados, la sangre se retiró mediante punción cardíaca directa y la muerte se confirmó mediante dislocación cervical.

20

Preparación de muestras de sangre completa y plasma. La sangre se recogió mediante punción cardíaca de todos los ratones en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Las muestras de sangre se colocaron inmediatamente en hielo y se dejaron coagular durante 60 minutos. Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 7 minutos, a 4 °C. Inmediatamente después de la centrifugación, el suero se transfirió con una pipeta estéril a viales previamente etiquetados y se congeló inmediatamente en hielo seco.

25

Preparación de muestras intestinales. Se extirpó el intestino grueso y se enjuagó con PBS y se registraron su longitud y peso húmedo, antes de cortar en las regiones proximal, media y distal y la fijación en la solución de Carnoy. Además, una pequeña muestra de colon se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido. El tejido fijado se deshidrató a través de una serie de alcoholes y xileno y se incluyó en parafina, usando un procesador de tejidos Leica TP1020 y una estación de trabajo EG1140H. Las secciones (5 µm de espesor) se cortaron usando un microtomo Leica RM2125RTF y se secaron al aire en portaobjetos de microscopio, durante una noche a 37 °C. Posteriormente, las diapositivas se descargaron en xileno y se rehidrataron a través de alcoholes graduados a PBS. Todas las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se montaron.

35

Análisis histológico: las secciones histológicas se evaluaron a ciegas. Las secciones se observaron al microscopio y se les asignó una puntuación de gravedad subjetiva que oscila entre 0 y 5, de acuerdo con los criterios descritos en la tabla E19. Se evaluaron hasta doce secciones transversales desde el intestino grueso medio y distal.

Tabla E19	
Sistema de puntuación de gravedad estándar de Epistem.	
Puntuación de gravedad	Descripción
0	Las criptas parecían normales.
1	Criptas presentes pero dañadas (patología anormal). No hay ulceración.
2	Algunas criptas se agotaron y algunas ulceración/inflamación.
3	20-70 % de las criptas se agotaron y aumento de la ulceración/inflamación.
4	> 70 % de criptas agotadas con una ulceración/inflamación sustancial.
5	No quedan criptas. Totalmente ulcerado/inflamado.

Análisis estadístico: donde se mencionó, las comparaciones estadísticas de los datos del grupo se realizaron usando ANOVA, en combinación con pruebas *post hoc*, utilizando Graph Pad Prism.

5

Análisis de qPCR: se extirpó el colon de ratón de los animales y se almacenó a -80 °C hasta el análisis. El ARN se preparó a partir de dos colonos usando el RNeasy Mini Kit de Qiagen (número de catálogo 74106). Una vez que el ARN se eluyó de la columna Qiagen, se hizo pasar por un Bioanalyzer 2100 de Agilent para poner a prueba la integridad del ARN y un NanoDrop para determinar la concentración y pureza del ARN. A continuación se almacenó el ARN a -80 °C.

10

La transcripción inversa (RT) de ARN a ADNc se realizó en un formato de placa de PCR de 96 pocillos en la máquina de PCR Mastercycler de Eppendorf con el siguiente programa: 37 °C durante 60 minutos, 95 °C durante 5 minutos. Los pocillos de borde de la placa de 96 pocillos no se usaron y se llenaron con 50 µl de agua para evitar la evaporación de los pocillos internos. Se usaron 100 ng de ARN en 25 µl de la mezcla maestra de transcripción inversa (Life Technologies n.º 4387406) por muestra de RT. Una vez que se completó la RT, la siguiente etapa fue amplificar previamente los genes de interés en la muestra de ADNc. Se combinaron cebadores de genes de interés (cebadores DELTAgene diseñados por Fluidigm) hasta una concentración final de 200 nM. Usando estos cebadores, los genes de interés se amplificaron previamente en cada muestra. La preamplificación se realizó en reacciones de 10 µl (2,5 µl de ADNc, 7,5 µl de mezcla maestra Pre-AMP) en formato de 384 pocillos usando una máquina de PCR ViiA7 de Applied Biosystems con el siguiente programa: 95 °C durante 10 minutos, 14 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 4 minutos. Después de la etapa de preamplificación, se añadió exonucleasa (New England BioLabs n.º de catálogo M0293L) para eliminar los cebadores no incorporados de cada muestra. Esta reacción de exonucleasa también se completó en la máquina de PCR ViiA7 con el siguiente programa: 37 °C durante 30 minutos, 80 °C durante 15 minutos. Después de la exonucleasa, la muestra de RT se diluyó adicionalmente a 1:5 (7 µl de muestra de exonucleasa + 18 µl de tampón de EDTA bajo).

El chip usado para ejecutar qPCR en el sistema Biomark de Fluidigm fue un 96.96 Dynamic Array IFC para la expresión génica. El chip se cebó primero con el controlador IFC HX de acuerdo con las recomendaciones del fabricante antes de cargar la muestra y los ensayos. Para preparar los ensayos que se cargarán en un chip, se prepararon 4,4 µl de la mezcla maestra del ensayo (reactivo de carga del ensayo 2X de Fluidigm n.º de catálogo 8500736 y bajo EDTA TE) a 3,6 µl los cebadores directos e inversos de 20 µM para cada gen de interés se prepararon en una placa de 96 pocillos. Para preparar muestras, se añadieron 4,5 µl de mezcla maestra de muestra (mezcla maestra de expresión de genes TaqMan 2X de Ambion, Reactivo de carga de ADN 20X de Fluidigm, número de catálogo 100-0388, y 20X EvaGreen de Biotium n.º de catálogo 31000) a 3 µl de muestra diluida preamplificada/exonucleasa en una placa de 96 pocillos. Una vez que se había cebado el chip, se cargaron en el chip 5 µl de una muestra o ensayo preparado anteriormente. El chip fue devuelto a continuación al controlador de IFC para que las muestras se carguen en el chip. Una vez que el chip terminó de cargarse, la qPCR podía ejecutarse en el Biomark usando un programa preestablecido para 96.96 Dynamic Array para la expresión génica con una curva de fusión para determinar la especificidad del cebador. La expresión génica relativa se determinó mediante el procedimiento Ct delta delta usando múltiples genes de mantenimiento.

Resultados:

Parámetros en vida: todos los grupos de receptores de TNBS demostraron una disminución aguda del peso corporal medio, de entre el 8-10 % del peso corporal inicial durante las primeras 24 horas después de la administración del agente colítico; posteriormente, hubo una disminución más lenta en el peso corporal medio, con todos los grupos mostrando una disminución significativa en el peso corporal medio entre 80-90 % del peso inicial al final del estudio ($p \leq 0,0158$). El peso corporal de los ratones tratados solo con vehículo mostró un cambio mínimo durante el período del estudio, con un peso corporal medio final del $99,6 \pm 1,7$ % del peso corporal inicial, el día 4 del

estudio (media $\pm$ desviación estándar). El grupo de TNBS/vehículo tuvo el peso corporal final medio más bajo, con un $79,8 \pm 1,8$ %. Los pesos corporales medios finales para algunos grupos (es decir, grupo de TNBS/Fc-HRS(2-60)-s.c. y grupo de TNBS/budesonida) fueron artificialmente altos, debido a la mayor incidencia de morbilidad temprana en estos grupos. De los grupos que demostraron la menor morbilidad temprana, el TNBS/Fc-HRS(2-60)-todos los días-i.v. El grupo tuvo el peso corporal final medio más alto del $85,6 \pm 7,1$ %, aunque no fue significativamente diferente del grupo de TNBS/vehículo ($p > 0,05$) (datos no mostrados).

La mayoría de los ratones receptores de TNBS demostraron diarrea en algún momento durante el estudio, aunque las observaciones de sangrado de la mucosa fueron menos comunes. Hubo reducciones en la incidencia de diarrea en respuesta a algunos tratamientos con artículos de prueba. El grupo de TNBS/vehículo tuvo una puntuación de diarrea acumulada (normalizada) de 31 al final del estudio el día 4; con los grupos de TNBS/Fc-HRS (2-60)-todos los días-i.v. y de TNBS/HRS(1-60)-Fc-todos los días-i.v. con las puntuaciones más bajas de 26 (datos no mostrados).

La afección clínica de los ratones se puede obtener mejor combinando información sobre el sangrado y la diarrea junto con una puntuación para la pérdida de peso, con el fin de obtener una puntuación del índice de actividad de la enfermedad (DAI). Esto puede determinarse con mayor precisión el día en que se sacrifica a un ratón, ya que los datos de observación de consistencia de heces faltantes se pueden complementar con observaciones de heces en el recto. Para los ratones que sobrevivieron el día 4, hubo un aumento significativo en las puntuaciones medias de DAI para todos los grupos de receptores de TNBS, en comparación con el grupo de control no tratado (a $p \leq 0,0062$), excepto para el grupo de TNBS/Fc-HRS(2-60)-sc, aunque en este grupo solo tres ratones permanecieron en el estudio en el punto final programado. El DAI medio para los ratones supervivientes en el día 4 en el grupo de TNBS/vehículo fue de $7,13 \pm 0,64$; en comparación, los grupos de TNBS/budesonida y TNBS/HRS(1-60)-Fc-una vez-i.v. tenían DAI medios significativamente más bajos, a $4,33 \pm 1,97$ y $4,20 \pm 3,03$, respectivamente ($p \leq 0,0304$). La inclusión de todos los ratones, que sobrevivieron al menos a las 07:00 horas del día 1, en el cálculo de DAI dio resultados similares, aunque el efecto observado en los grupos de TNBS/budesonida y TNBS/HRS (1-60)-Fc-una vez-i.v. ya no eran significativo ($p > 0,05$) (véase la **figura 24A**).

Observaciones post mortem - Para los ratones con solo vehículo, el peso y la longitud del intestino grueso medios fueron de $200,4 \pm 21,7$ mg y $108,3 \pm 7,8$ mm, respectivamente; la relación peso/longitud del intestino grueso media fue de $1,85 \pm 0,12$ (mg/mm). Todos los grupos tratados con TNBS demostraron un aumento significativo en el peso del intestino grueso con respecto a los ratones de control no tratados ($p \leq 0,0215$), con el grupo de TNBS/vehículo que tiene un peso intestinal medio de $368,4 \pm 70,1$ mg. El grupo de TNBS/budesonida tuvo el peso intestinal medio más bajo de todos los grupos receptores de TNBS, con $298,0 \pm 62,0$ mg. La administración de TNBS también se asoció con una reducción significativa en la longitud del intestino grueso en todos los grupos receptores de TNBS ($p \leq 0,0285$), con el grupo de TNBS/vehículo teniendo una longitud media del intestino grueso de $75,6 \pm 9,3$ mm; en comparación, el grupo de TNBS/HRS(1-60)-Fc-todos los días-i.v. demostró una mejoría significativa del acortamiento del intestino grueso, con una longitud media del intestino grueso de $94,9 \pm 11,8$ mm ($p = 0,0019$). Los cambios en el peso y la longitud del intestino grueso dieron como resultado un aumento significativo en la relación peso:longitud del intestino grueso para todos los grupos receptores de TNBS ($p \leq 0,0116$). El grupo de TNBS/vehículo tenía la relación media más alta entre peso:longitud del intestino grueso de todos los grupos, en $4,92 \pm 0,99$ (mg/mm). El grupo de TNBS/budesonida, el grupo de TNBS/Fc-HRS(2-60)-s.c., el grupo de TNBS/HRS(1-60)-Fc-todos los días-i.v. y el grupo de TNBS/HRS(1-60)-Fc-una vez-i.v. demostraron todos una reducción significativa en la relación peso:longitud del intestino grueso, con respecto al grupo de control de TNBS/vehículo, aunque la relación media para el grupo de TNBS/HRS(1-60)-Fc-todos los días-i.v. estuvo distorsionada por la cantidad de ratones que se sacrificaron al inicio del estudio. Las relaciones medias de peso:longitud del intestino grueso para los grupos de TNBS/budesonida y TNBS/HRS(1-60)-Fc-todos los días-i.v. fueron $3,57 \pm 1,01$ y $3,56 \pm 0,80$, respectivamente ($p = 0,0143$ y $p = 0,0456$) (véase la **figura 24B**).

Histopatología - Los cambios histopatológicos asociados con la colitis inducida por TNBS se evaluaron de acuerdo con el procedimiento estándar de puntuación histológica de Epistem. Todos los grupos de receptores de TNBS demostraron un aumento significativo en la puntuación de histopatología ($p \leq 0,0036$). El grupo de linfocitos T/vehículo tuvo una puntuación histopatológica media de $2,32 \pm 0,65$, con el grupo de TNBS/HRS(1-60)-Fc -s.c. con la puntuación media más alta en histopatología: $2,41 \pm 0,68$. Otros grupos de tratamiento tuvieron puntuaciones medias más bajas en histopatología que el grupo de TNBS/vehículo, con los grupos de TNBS/budesonida y TNBS/Fc-HRS(2-60)-todos los días-i.v. teniendo las puntuaciones más bajas de $1,66 \pm 1,08$ y $1,68 \pm 1,03$, respectivamente, aunque estas reducciones no fueron estadísticamente significativas. A nivel regional, el efecto de estos tratamientos fue más evidente en el tercio distal del intestino grueso, aunque todavía sin significación estadística.

Morbilidad - Solo un grupo, TNBS/HRS (1-60)-Fc-todos los días-i.v. demostró la supervivencia de todos los ratones (elegibles) (se excluyó el ratón 75 debido a la gran perforación intestinal durante la administración de TNBS y se

excluyó el ratón 78 debido a la falta de inducción de la enfermedad). La supervivencia en otros grupos varió del 80 % (grupo de TNBS/Fc-HRS(2-60)-todos los días-i.v.) al 33,3 % (grupo de TNBS/Fc-HRS(2-60)-s.c.); la supervivencia en el grupo de TNBS/budesonida fue del 60 %. Los ratones se sacrificaron cuando presentaron mal estado (se retiraron/no consiguieron demostrar un comportamiento normal); a pesar de los controles de seis horas, dos ratones (40 y 50) fueron encontrados muertos a las 19:00 horas del día 3 del estudio (datos no mostrados).

Resultados de qPCR. Para investigar más a fondo la base mecánica de los efectos de HRS(1-60) y Fc-HRS(2-60) sobre la colitis inducida por TNBS, se examinaron los cambios en la expresión génica en los cólores de animales después de la finalización del estudio. El perfil de ARN se realizó en dos cólores aislados de los ratones en el día 10 como se ha descrito anteriormente. Los resultados de estos estudios demostraron que siete genes se elevaron en más de 10 veces en respuesta al tratamiento con TNBS y se redujeron significativamente mediante el tratamiento con Fc-HRS(2-60) (véase la tabla E20 y la figura 25).

Tabla E20	
Genes regulados en más de 10 veces	
IL6	
IL1b	
MCP1	
MMP3	
MMP9	
CD11B	
IL10	

15 El perfil transcripcional de cólores de ratón tratados con TNBS reveló muchos genes, incluidos varios genes de mantenimiento (datos no mostrados) que no se vieron afectados significativamente por el tratamiento con Fc-HRS(2-60). Por el contrario, el perfil transcripcional de los cólores de ratón tratados con TNBS reveló una reducción significativa de los genes relacionados con el sistema inmunitario e inflamatorio regulados por TNBS por Fc-HRS(2-60). Este resultado se vio fortalecido por el descubrimiento de que HRS(1-60) también reduce significativamente los niveles de MCP1, MMP3, CD11b e IL10 inducidos por TNBS (véase las **figuras 26A-26H**).

Conclusión: la administración intracolónica de TNBS a ratones BDF-1 dio como resultado el desarrollo de colitis caracterizada por una pérdida de peso aguda, con un aumento moderado en la incidencia de diarrea y sangrado de la mucosa. La exploración *post mortem* demostró un cambio significativo en la relación de peso:longitud del intestino grueso y lesiones ulcerativas en el intestino grueso, con estenosis y acumulación de heces en el intestino. El tratamiento con budesonida se asoció con mejoras en los parámetros de la enfermedad tanto en vida como *post mortem*, y aunque tiene la puntuación media más baja en histopatología de todos los grupos de receptores de TNBS, la reducción de este parámetro de la enfermedad no alcanzó significación. El tratamiento con Fc-HRS(2-60)-todos los días-i.v. tuvo un efecto similar a la budesonida en la reducción de la puntuación de histopatología y se asoció con una supervivencia superior. El grupo de TNBS/HRS(1-60)-Fc-todos los días-i.v. mostró el nivel más alto de supervivencia y mejora significativa en la relación de peso:longitud del intestino grueso, aunque fue menos eficaz que budesonida o Fc-HRS(2-60) para reducir la puntuación de histopatología. Con respecto a la puntuación de histopatología, los tres de estos artículos de prueba parecieron tener su mayor efecto en el tercio distal del intestino grueso. Se observaron mejoras en los parámetros de la enfermedad para el grupo de TNBS/Fc-HRS(2-60)-s.c. y el grupo de TNBS/HRS(1-60)-Fc-una vez-i.v. (por ejemplo, peso corporal y relación peso:longitud del intestino grueso). Adicionalmente, el perfil transcripcional de los cólores de ratón tratados con TNBS reveló una reducción significativa de los genes relacionados con el sistema inmunitario e inflamatorio regulados por TNBS por Fc-HRS (2-60). Este resultado se vio fortalecido por el descubrimiento de que HRS(1-60) también reduce significativamente los niveles de MCP1, MMP3, CD11b e IL10 inducidos por TNBS, demostrando que las proteínas de fusión HRS-Fc eran activas en la expresión de genes inmunomoduladores en este sistema.

En general, los datos sugieren que Fc-HRS(2-60) y HRS(1-60)-Fc tienen un potencial significativo en el tratamiento de la inflamación intestinal y otras afecciones inflamatorias.

45 EJEMPLO 10

IMPACTO DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN HRS-FC SOBRE LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS T

Para evaluar el impacto potencial de los conjugados HRS-Fc sobre las poblaciones de linfocitos T *in vivo*, se puso a prueba Fc-HRS(2-60) en un modelo de colitis inducida por TNBS, similar al descrito anteriormente. Los estudios se

realizaron en ratones BDF-1 macho. En resumen, los ratones BDF-1 macho (Jackson Laboratories) se aclimataron durante un mínimo de 1 semana antes de la experimentación, se mantuvieron en ayunas 16 horas antes de la administración de TNBS y 13 horas antes de la dosificación. Se administró Fc-HRS(2-60) en una dosis única, 0,5 mg/kg, IV al mismo tiempo que comenzaba el tratamiento con TNBS. Se analizaron esplenocitos de tres animales por grupo para determinar las poblaciones inmunes. Para elegir los animales para el análisis, se excluyeron los ratones que tenían las puntuaciones de enfermedad más graves y menos graves (de acuerdo con las observaciones clínicas, la consistencia de las heces y el peso corporal). De los animales restantes, se seleccionaron tres animales de cada grupo de tratamiento en función de la media de su grupo respectivo.

- 10 **Procedimientos.** Se recogieron los bazos de ratones BDF-1 y se colocaron directamente en 10 ml de tampón de tinción de células frío (Biolegend, n.º de catálogo 420201, n.º de lote B166478) en hielo. Los bazos se disociaron mecánicamente entre dos portaobjetos autoclavados esmerilados en una placa de cultivo tisular. La suspensión celular se filtró a través de un filtro de 70 µm y las células se sedimentaron mediante centrifugación a 300 g durante 5 minutos a 4 °C. Las células se lavaron una vez en 10 ml de tampón de tinción celular y se contaron con el contador de viabilidad celular Nexcelom Cellometer Auto 2000. Los esplenocitos se reconstituyeron a 5×10^5 células/ml en tampón de tinción celular y se tiñeron inmediatamente con anticuerpos para citometría de flujo.

- Se tiñeron un total de 1×10^6 células para los marcadores reguladores T (CD4, CD25 y FOXP3) usando el kit One Step Staining Mouse Treg Flow Kit (Biolegend n.º de catálogo 13680, números de lote B177852, B177853, B174309, B176365) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- Para el fenotipado de células inmunitarias, se tiñeron un total de 1×10^6 células con anticuerpos marcados con fluorescencia contra CD3ε (n.º de catálogo 100334, n.º de lote 162956), CD4 (n.º de catálogo 100529, n.º de lote B152907) y CD8 (n.º de catálogo 100714, n.º de lote B165226) (los anticuerpos se adquirieron de Biolegend). Las células se tiñeron con anticuerpos diluidos a las concentraciones recomendadas por el fabricante en tampón de tinción celular y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron a fondo con tampón de tinción celular y se fijaron usando tampón fijador estabilizante (BD Biosciences n.º de catálogo 338036, n.º de lote 2291614).

- 30 La citometría de flujo se realizó en las instalaciones del VA Flow Cytometry Research Core (VA San Diego, La Jolla, CA). Las muestras se analizaron en un instrumento de canto BD de 3 láseres (488 argón, 633 HeNe, 405 violeta). Los archivos FACS sin procesar se analizaron utilizando el software FlowJo (TreeStar).

- Resultados.** Los esplenocitos teñidos de manera extracelular se acotaron en una población de linfocitos vivos y linfocitos CD3⁺ para determinar el porcentaje total de linfocitos T. Para generar porcentajes de población de CD4⁺ y CD8⁺, las células se acotaron en linfocitos T CD3⁺CD4⁺ y linfocitos T CD3⁺CD8⁺ doble positivos del acotamiento de linfocitos vivos. Los linfocitos T reguladores (Treg) se acotaron en un acotamiento de linfocitos vivos y a continuación en linfocitos CD4⁺. Los linfocitos Treg se determinaron basándose en la expresión de CD25 y FoxP3. En estos datos (véase las figuras 27A-27D), cada punto representa un animal, la línea representa la media.

- En ratones tratados con TNBS, hubo un aumento en los linfocitos T CD3⁺ (**figura 27A**), en comparación con los animales sin tratamiento previo. Por el contrario, dos de los tres ratones tratados con Fc-HRS(2-60) mostraron una reducción en los linfocitos T CD3⁺ en comparación con los animales tratados con TNBS. Para determinar qué poblaciones de CD3⁺ fueron responsables de este cambio, se investigaron adicionalmente las poblaciones de linfocitos CD8⁺, CD4⁺ y Treg. Las **figuras 27B y 27C** muestran que los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ estaban elevados en animales tratados con TNBS y el tratamiento con Fc-HRS (2-60) redujo los niveles en ambos casos. Además, los linfocitos Treg se agotaron en animales tratados con TNBS, en comparación con animales sin tratamiento previo, pero se elevaron en comparación con los animales tratados con TNBS en el grupo tratado con Fc-HRS (2-60) (**figura 27D**). Además, un ratón tratado con Fc-HRS(2-60) mostró niveles de Treg similares a los animales sin tratamiento previo. Juntos, estos resultados sugieren que TNBS altera las poblaciones de linfocitos T en el bazo a un fenotipo más inflamatorio a través del aumento de los linfocitos T CD8⁺ y la disminución de los linfocitos Treg y que el tratamiento con Fc-HRS(2-60) restaura estas poblaciones hacia los niveles homeostáticos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Ying BUECHLER y col.
 <120> CONJUGADOS DE Fc-HISTIDIL-ARNt SINTETASA
 <130> ATYR-116/01WO
 <150>US 61/789,011
 <151> 2013-03-15

<160> 396
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 509
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1              5              10              15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35              40              45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65              70              75              80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
          85              90              95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
          100             105             110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
          115             120             125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130             135             140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145             150             155             160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe

```

10

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
500 505

<210> 2

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Leu Leu Gly Leu Leu Pro Arg Arg Ala Trp Ala Ser Leu Leu
1 5 10 15

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

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

His Gln Glu Lys Pro Asn Phe Ile Ile Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg
50 55 60

Asp Leu Ser Pro Gln His Met Val Val Arg Glu Lys Ile Leu Asp Leu
65 70 75 80

Val Ile Ser Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Lys Gly Met Asp Thr Pro
85 90 95

Ala Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Thr Glu Lys Tyr Gly Glu Asp Ser
100 105 110

Gly Leu Met Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu
115 120 125

10

ES 2 708 565 T3

Arg Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys
 130 135 140
 Val Lys Lys Met Lys Arg Tyr His Val Gly Lys Val Trp Arg Arg Glu
 145 150 155 160
 Ser Pro Thr Ile Val Gln Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Cys Gln Cys Asp
 165 170 175
 Phe Asp Ile Ala Gly Gln Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys
 180 185 190
 Leu Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Gly Leu Gln Leu Gly Asp Phe
 195 200 205
 Leu Ile Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Val Asp Gly Met Phe Ala Val
 210 215 220
 Cys Gly Val Pro Glu Ser Lys Phe Arg Ala Ile Cys Ser Ser Ile Asp
 225 230 235 240
 Lys Leu Asp Lys Met Ala Trp Lys Asp Val Arg His Glu Met Val Val
 245 250 255
 Lys Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val
 260 265 270
 Gln Cys His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Met Phe Gln Asp Pro
 275 280 285
 Arg Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys
 290 295 300
 Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Ala Asp Lys Ile Ser
 305 310 315 320
 Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile
 325 330 335
 Tyr Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Thr Gln Ala Gly Glu Glu Pro
 340 345 350
 Leu Asn Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val
 355 360 365
 Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly His Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser
 370 375 380

ES 2 708 565 T3

Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Tyr Ile Val Glu Gln Arg Met Lys Thr
385 390 395 400

Lys Gly Glu Lys Val Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Phe Val Ala Thr
405 410 415

Pro Gln Lys Asn Phe Leu Gln Glu Arg Leu Lys Leu Ile Ala Glu Leu
420 425 430

Trp Asp Ser Gly Ile Lys Ala Glu Met Leu Tyr Lys Asn Asn Pro Lys
435 440 445

Leu Leu Thr Gln Leu His Tyr Cys Glu Ser Thr Gly Ile Pro Leu Val
450 455 460

Val Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Glu Gly Val Ile Lys Ile Arg
465 470 475 480

Ser Val Ala Ser Arg Glu Glu Val Ala Ile Lys Arg Glu Asn Phe Val
485 490 495

Ala Glu Ile Gln Lys Arg Leu Ser Glu Ser
500 505

<210> 3

<211> 141

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

10

ES 2 708 565 T3

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met
130 135 140

<210> 4

<211> 408

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130 135 140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145 150 155 160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
165 170 175

10

ES 2 708 565 T3

```

Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
      180                               185                               190

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
      195                               200                               205

Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys
      210                               215                               220

Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
      225                               230                               235                               240

Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
      245                               250                               255

Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
      260                               265                               270

Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
      275                               280                               285

Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
      290                               295                               300

Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
      305                               310                               315                               320

Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
      325                               330                               335

Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
      340                               345                               350

Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
      355                               360                               365

Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
      370                               375                               380

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
      385                               390                               395                               400

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu
      405

```

<210> 5

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 708 565 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu

<210> 6

<211> 60

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
50 55 60

10

<210> 7

<211> 270

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

<210> 8
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 8

```

Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu
1          5          10          15

Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile
20          25          30

Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu
35          40          45

Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu
50          55          60

Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg
65          70          75          80

Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg
85          90          95

Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
100          105
  
```

10 <210> 9

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

15 <400> 9

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1          5          10          15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35          40          45
  
```

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala
305 310 315 320

Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn
325 330 335

Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile
340 345 350

Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr
355 360 365

Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile
370 375 380

Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
385 390 395

<210> 10

<211> 359

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys
65 70 75 80

Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp
85 90 95

Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu
100 105 110

Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser
115 120 125

10

ES 2 708 565 T3

Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln
 130 135 140
 Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr
 145 150 155 160
 Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg
 165 170 175
 Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr Glu Ala Val Leu Leu Gln
 180 185 190
 Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu Gly Val Gly Ser Val Ala
 195 200 205
 Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly
 210 215 220
 Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe
 225 230 235 240
 Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr
 245 250 255
 Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu
 260 265 270
 Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala
 275 280 285
 Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr
 290 295 300
 Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu
 305 310 315 320
 Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu
 325 330 335
 Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr
 340 345 350
 Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
 355

<210> 11
 <211> 399
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

Pro Leu Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu
245 250 255

Val Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu
260 265 270

Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu
275 280 285

Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala
290 295 300

Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu
305 310 315 320

Ile Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro
325 330 335

Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu
340 345 350

Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu
355 360 365

Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu
370 375 380

Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
385 390 395

<210> 12

<211> 473

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

10

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

305 310 315 320
 Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly Met Phe Asp Pro
 325 330 335
 Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg
 340 345 350
 Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile
 355 360 365
 Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu
 370 375 380
 Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile
 385 390 395 400
 Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu
 405 410 415
 Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu
 420 425 430
 Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg
 435 440 445
 Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg
 450 455 460
 Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
 465 470

<210> 13

<211> 469

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Glu Thr Leu Met

10

ES 2 708 565 T3

50		55		60
Gly 65	Lys Tyr Gly	Glu Asp Ser Lys Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln 80		
		70		
Gly 65	Gly Glu Leu 85	Leu Ser Leu Arg Tyr Asp 90	Leu Thr Val Pro Phe Ala 95	
Arg Tyr Leu 100	Ala Met Asn Lys Leu Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile 110			
Ala Lys Val 115	Tyr Arg Arg Asp Asn Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr 125			
Arg Glu Phe Tyr Gln Cys 130	Asp Phe Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro 140			
Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu Lys Ile 145	Met Cys Glu Ile Leu Ser 160			
Ser Leu Gln Ile 165	Gly Asp Phe Leu Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile 175			
Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg 180				
Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu 195				
Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala 210				
Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val 225				
Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu 245				
Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe 260				
Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu 275				
Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro 290				

ES 2 708 565 T3

Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly
305 310 315 320

Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys
325 330 335

Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile
340 345 350

Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu
355 360 365

Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg
370 375 380

Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu
385 390 395 400

Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu
405 410 415

Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys
420 425 430

Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp
435 440 445

Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln
450 455 460

Pro Leu Cys Ile Cys
465

<210> 14

<211> 435

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

10

ES 2 708 565 T3

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
 65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
 85 90 95

Phe Glu Leu Lys Asp Phe Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile
 100 105 110

Pro Asp Ala Glu Cys Leu Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu
 115 120 125

Gln Ile Gly Asp Phe Leu Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp
 130 135 140

Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys
 165 170 175

Asn Glu Met Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg
 180 185 190

Ile Gly Asp Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln
 195 200 205

Leu Leu Gln Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly
 210 215 220

Leu Gly Asp Leu Lys Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile
 225 230 235 240

Asp Asp Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr
 245 250 255

Tyr Thr Gly Val Ile Tyr Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln
 260 265 270

Ala Gly Glu Glu Pro Leu Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg
 275 280 285

Tyr Asp Gly Leu Val Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro
 290 295 300

ES 2 708 565 T3

Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu
 305 310 315 320
 Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln
 325 330 335
 Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys
 340 345 350
 Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr
 355 360 365
 Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala
 370 375 380
 Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly
 385 390 395 400
 Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg
 405 410 415
 Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
 420 425 430
 Cys Ile Cys
 435

<210> 15
 <211> 171
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Ala Leu Glu Glu
 50 55 60
 Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys
 65 70 75 80

10

ES 2 708 565 T3

Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp Asp Ala
85 90 95

Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn
100 105 110

Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Ile
115 120 125

Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser Val Thr
130 135 140

Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu Glu Ile
145 150 155 160

Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
165 170

<210> 16

<211> 211

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln
100 105 110

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

10

ES 2 708 565 T3

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

<210> 17
 <211> 141
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

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

10

<210> 18

ES 2 708 565 T3

<211> 143
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 18

```

Cys Leu Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp
1          5          10          15

Phe Leu Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala
          20          25          30

Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val
          35          40          45

Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val
          50          55          60

Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr
65          70          75          80

Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp
          85          90          95

Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu
          100          105          110

Lys Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile
          115          120          125

Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly
          130          135          140

```

<210> 19
10 <211> 509
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 19

15

```

Met Ala Asp Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Arg Leu Gln Gly Ala
1          5          10          15

His Val Arg Gly Leu Lys Glu Gln Lys Ala Ser Ala Glu Gln Ile Glu
          20          25          30

```


ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

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

<210> 20

<211> 509

5 <212> PRT

<213> Canis lupus familiaris

<400> 20

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

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

500

505

5 <210> 21
<211> 509

ES 2 708 565 T3

<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 21

5

```

Met Ala Asp Arg Ala Ala Leu Glu Asp Leu Val Arg Val Gln Gly Glu
 1          5          10          15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Gly Lys Pro Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
          50          55          60

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65          70          75          80

Ile Ser Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
          85          90          95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
          100          105          110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
          115          120          125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
          130          135          140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145          150          155          160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
          165          170          175

Asp Ile Ala Gly Gln Phe Asp Pro Met Leu Pro Asp Ala Glu Cys Leu
          180          185          190

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
          195          200          205

Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys

```

ES 2 708 565 T3

210		215		220
Gly Val Pro Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys				
225		230		235 240
Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu				
		245	250	255
Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln				
	260		265	270
Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys				
	275	280		285
Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu				
	290	295	300	
Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Ala Asp Lys Ile Ser Phe				
305		310	315	320
Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr				
	325		330	335
Glu Ala Val Leu Leu Gln Pro Pro Ala Arg Ala Gly Glu Glu Pro Leu				
	340	345		350
Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly				
	355	360		365
Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile				
	370	375	380	
Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu				
385		390	395	400
Glu Glu Lys Val Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala				
	405		410	415
Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Ile Ser Glu Leu Trp				
	420	425		430
Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu				
	435	440	445	
Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Thr Gly Ile Pro Leu Val Ala				
450		455	460	

ES 2 708 565 T3

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Ala Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Ser Gln Pro Leu Cys Ile Cys
500 505

<210> 22

<211> 508

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 22

Met Ala Asp Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Arg Leu Gln Gly Ala
1 5 10 15

His Val Arg Gly Leu Lys Glu Gln Lys Ala Ser Ala Glu Gln Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Val Thr Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly His Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130 135 140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145 150 155 160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
165 170 175

ES 2 708 565 T3

Asp Ile Ala Gly Gln Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
 180 185 190

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asn Phe Gln
 195 200 205

Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Val Cys
 210 215 220

Gly Val Pro Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
 225 230 235 240

Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
 245 250 255

Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270

Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285

Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Val Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300

Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320

Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335

Glu Ala Val Leu Leu Gln Met Pro Thr Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350

Gly Val Gly Ser Ile Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365

Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Lys Leu Glu Ala Ser
 385 390 395 400

Glu Glu Lys Val Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Ile Ser Glu Leu Trp
 420 425 430

ES 2 708 565 T3

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Arg Arg Arg Thr Ser Gln Pro Leu Ser Met
500 505

<210> 23

<211> 500

5 <212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 23

Met Ala Asp Glu Ala Ala Val Arg Gln Gln Ala Glu Val Val Arg Arg
1 5 10 15

Leu Lys Gln Asp Lys Ala Glu Pro Asp Glu Ile Ala Lys Glu Val Ala
20 25 30

Lys Leu Leu Glu Met Lys Ala His Leu Gly Gly Asp Glu Gly Lys His
35 40 45

Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Gly Pro Lys
50 55 60

Gln Met Ala Ile Arg Glu Arg Val Phe Ser Ala Ile Ile Ala Cys Phe
65 70 75 80

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

Glu Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys Leu Ile Tyr Asp
100 105 110

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

Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Ile Thr Asn Ile Lys
130 135 140

10

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu
405 410 415

Glu Glu Arg Leu Lys Leu Ile Ser Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys
420 425 430

Ala Glu Val Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln
435 440 445

Tyr Cys Glu Asp Thr Gly Ile Pro Leu Val Ala Ile Val Gly Glu Gln
450 455 460

Glu Leu Lys Asp Gly Val Val Lys Leu Arg Val Val Ala Thr Gly Glu
465 470 475 480

Glu Val Asn Ile Arg Arg Glu Ser Leu Val Glu Glu Ile Arg Arg Arg
485 490 495

Thr Asn Gln Leu
500

<210> 24

<211> 437

5 <212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 24

Met Ala Ala Leu Gly Leu Val Ser Met Arg Leu Cys Ala Gly Leu Met
1 5 10 15

Gly Arg Arg Ser Ala Val Arg Leu His Ser Leu Arg Val Cys Ser Gly
20 25 30

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

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

Thr Ala Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Asn Pro Lys Gln Met Ala Ile Arg
65 70 75 80

Glu Lys Val Phe Asn Ile Ile Ile Asn Cys Phe Lys Arg His Gly Ala
85 90 95

Glu Thr Ile Asp Ser Pro Val Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Thr Gly
100 105 110

10

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

355

360

365

Val Ser Val Gly Ser Val Ala Gly Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val
370 375 380

Gly Met Phe Asp Pro Lys Ala Gly Lys Cys Pro Val Trp Gly Ser Ala
385 390 395 400

Leu Ala Leu Arg Gly Ser Ser Pro Ser Trp Ser Arg Arg Gln Ser Cys
405 410 415

Leu Gln Arg Arg Cys Ala Pro Leu Lys Leu Lys Cys Leu Trp Leu Gln
420 425 430

His Arg Arg Thr Phe
435

<210> 25

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu

10

ES 2 708 565 T3

130		135		140
Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn				
145		150		155
Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe				
	165		170	175
Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu				
	180		185	190
Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu				
	195		200	205
Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys				
	210		215	220
Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys				
225		230		235
Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu				
	245		250	255
Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln				
	260		265	270
Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys				
	275		280	285
Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu				
	290		295	300
Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe				
305		310		315
Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr				
	325		330	335
Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu				
	340		345	350
Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly				
	355		360	365
Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile				
	370		375	380

ES 2 708 565 T3

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
385 390 395 400

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
405 410 415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
500 505

<210> 26

<211> 48

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

<210> 27

<211> 80

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 27

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu

ES 2 708 565 T3

20 25 30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

<210> 28
<211> 79
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

10 Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val
65 70 75

<210> 29
<211> 78
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 29

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

20 Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp
65 70 75

ES 2 708 565 T3

<210> 30

<211> 77

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 30

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe
65 70 75

10

<210> 31

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 31

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val
65 70 75

20 <210> 32

<211> 75

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 32

ES 2 708 565 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys
65 70 75

<210> 33

<211> 74

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

10 Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu
65 70

<210> 34

<211> 73

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 34

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu

20

ES 2 708 565 T3

20

25

30

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg
65 70

<210> 35

<211> 72

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val
65 70

10

<210> 36

<211> 71

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 36

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

20

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala
65 70

ES 2 708 565 T3

<210> 37

<211> 70

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 37

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met
65 70

10

<210> 38

<211> 69

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 38

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln
65

20 <210> 39

<211> 68

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 39

ES 2 708 565 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg
65

<210> 40

<211> 67

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro
65

10

<210> 41

<211> 66

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 41

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu

20

ES 2 708 565 T3

20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
 50 55 60
 Tyr Ser
 65
 <210> 42
 <211> 65
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
 50 55 60
 Tyr
 65
 10 <210> 43
 <211> 64
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
 50 55 60
 20 <210> 44
 <211> 63

ES 2 708 565 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

5

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

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

```

<210> 45
<211> 62
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr
          50          55          60

```

15

<210> 46
<211> 61
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1          5          10          15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly
          50          55          60

```

25

<210> 47

ES 2 708 565 T3

<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 47

```
Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1              5              10              15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
              35              40              45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
 50              55              60
```

<210> 48
10 <211> 59
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

15

```
Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1              5              10              15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
              35              40              45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro
 50              55
```

<210> 49
<211> 58
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

25

```
Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1              5              10              15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
              35              40              45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr
 50              55
```


ES 2 708 565 T3

<210> 50

<211> 57

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 50

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys
50 55

10

<210> 51

<211> 56

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 51

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu
50 55

20 <210> 52

<211> 55

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 52

ES 2 708 565 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val
50 55

<210> 53

<211> 54

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe
50

<210> 54

<211> 53

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 54

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys

20

50

<210> 55

<211> 52

25 <212> PRT

ES 2 708 565 T3

<213> Homo sapiens

<400> 55

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln
50

5

<210> 56

<211> 51

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 56

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys
50

15

<210> 57

<211> 50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 57

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser
50

25

<210> 58

<211> 49

ES 2 708 565 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

5
Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45
Glu

<210> 59
<211> 48
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
20 25 30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
15 35 40 45

<210> 60
<211> 47
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 60

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
25 20 25 30
Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro
35 40 45

<210> 61
<211> 46
30 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

ES 2 708 565 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

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

<210> 62

<211> 45

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

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

10

<210> 63

<211> 44

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 63

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

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

20

<210> 64

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 64

ES 2 708 565 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala
35 40

<210> 65

<211> 42

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys
35 40

10

<210> 66

<211> 41

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 66

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu
35 40

20

<210> 67

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 67

ES 2 708 565 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys
35 40

<210> 68

<211> 79

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg
1 5 10 15

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

Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu
35 40 45

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

Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75

10

<210> 69

<211> 78

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 69

Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val
1 5 10 15

Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu
20 25 30

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

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

Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75

20

<210> 70

<211> 77

ES 2 708 565 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

5

```

Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg
1          5          10          15

Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val
          20          25          30

Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys
          35          40          45

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

Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65          70          75

```

<210> 71
<211> 76
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

```

Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly
1          5          10          15

Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala
          20          25          30

Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln
          35          40          45

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

Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65          70          75

```

15

<210> 72
<211> 75
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 72

ES 2 708 565 T3

Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu
1 5 10 15

Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys
20 25 30

Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys
35 40 45

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

Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75

<210> 73

<211> 74

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys
1 5 10 15

Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu
20 25 30

Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe
35 40 45

Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met
50 55 60

Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70

10

<210> 74

<211> 73

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 74

Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln
1 5 10 15

Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu
20 25 30

20

ES 2 708 565 T3

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

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

Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70

<210> 75

<211> 72

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln
1 5 10 15

Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys
20 25 30

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

Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val
50 55 60

Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70

10

<210> 76

<211> 71

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 76

Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys
1 5 10 15

Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu
20 25 30

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

Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg
50 55 60

Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70

20

<210> 77

ES 2 708 565 T3

<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 77

```

Val Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala
1          5          10          15

Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys
          20          25          30

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

Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu
          50          55          60

Lys Val Phe Asp Val Ile
65          70

```

<210> 78
10 <211> 69
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

15

```

Lys Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser
1          5          10          15

Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala
          20          25          30

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

Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys
          50          55          60

Val Phe Asp Val Ile
65

```

<210> 79
<211> 68
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

ES 2 708 565 T3

Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala
1 5 10 15

Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln
20 25 30

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

Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val
50 55 60

Phe Asp Val Ile
65

<210> 80

<211> 67

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu
1 5 10 15

Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu
20 25 30

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

Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe
50 55 60

Asp Val Ile
65

10

<210> 81

<211> 66

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 81

Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu
1 5 10 15

Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly
20 25 30

20

ES 2 708 565 T3

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

Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp
50 55 60

Val Ile
65

<210> 82

<211> 64

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
1 5 10 15

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
20 25 30

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
35 40 45

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
50 55 60

<210> 83

<211> 63

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 83

Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu
1 5 10 15

Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu
20 25 30

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

Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
50 55 60

<210> 84

<211> 62

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

ES 2 708 565 T3

Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu
1 5 10 15

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

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

Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
50 55 60

<210> 85

<211> 61

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val
1 5 10 15

Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys
20 25 30

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

Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
50 55 60

10

<210> 86

<211> 60

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 86

Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala
1 5 10 15

Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln
20 25 30

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

Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile

20

50

55

60

<210> 87

<211> 59

25 <212> PRT

ES 2 708 565 T3

<213> Homo sapiens

<400> 87

Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys
1 5 10 15

Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys
20 25 30

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

Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
50 55

5

<210> 88

<211> 58

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 88

Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu
1 5 10 15

Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe
20 25 30

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

Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
50 55

15

<210> 89

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 89

Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu
1 5 10 15

Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val
20 25 30

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

Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
50 55

25

<210> 90

<211> 56

ES 2 708 565 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

5

```

Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys
1          5          10          15

Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu
          20          25          30

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

Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
          50          55

```

<210> 91

<211> 55

10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91

```

Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu
1          5          10          15

Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys
          20          25          30

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

Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
          50          55

```

15

<210> 92

<211> 54

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 92

```

Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys

```

25

ES 2 708 565 T3

```

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

```

<210> 93
 <211> 53
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 93

Ala Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala
1 5 10 15

Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro
20 25 30

Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys
35 40 45

Val Phe Asp Val Ile
50

<210> 94
<211> 52
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens
<400> 94

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

20
 <210> 95
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 95

ES 2 708 565 T3

Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu
1 5 10 15

Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly
20 25 30

Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe
35 40 45

Asp Val Ile
50

<210> 96

5 <211> 50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

10

Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly
1 5 10 15

Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr
20 25 30

Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp
35 40 45

Val Ile
50

<210> 97

<211> 49

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro
1 5 10 15

Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg
20 25 30

Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val
35 40 45

20

Ile

<210> 98

25 <211> 48

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 708 565 T3

<400> 98

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
1 5 10 15

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp
20 25 30

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40 45

5 <210> 99

<211> 47

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 99

Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu
1 5 10 15

Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr
20 25 30

Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40 45

<210> 100

15 <211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

20

Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser
1 5 10 15

Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser
20 25 30

Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40 45

<210> 101

<211> 45

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

ES 2 708 565 T3

Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys
1 5 10 15

Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro
20 25 30

Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40 45

<210> 102

<211> 44

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln
1 5 10 15

Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg
20 25 30

Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40

10

<210> 103

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 103

Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys
1 5 10 15

Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln
20 25 30

Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40

20

<210> 104

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 104

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

ES 2 708 565 T3

1 5 10 15
Val Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met
20 25 30
Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40

<210> 105
<211> 41
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 105

Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val
1 5 10 15
Leu Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala
20 25 30
Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40

10
<210> 106
<211> 40
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens
<400> 106

Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu
1 5 10 15
Lys Thr Pro Lys Gly Thr Arg Asp Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val
20 25 30
Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
35 40

20
<210> 107
<211> 275
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> Proteína de fusión Fc-HRS (fusión Fc C-terminal)
<400> 107

30 Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

ES 2 708 565 T3

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

<211> 275

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Proteína de fusión Fc-HRS (fusión Fc N-terminal)

<400> 108

```

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 1          5          10          15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
      20          25          30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
      35          40          45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
      50          55          60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65          70          75          80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
      85          90          95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
      100          105          110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
      115          120          125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
      130          135          140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
      145          150          155          160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
      165          170          175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
      180          185          190

```

ES 2 708 565 T3

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu
225 230 235 240

Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu
245 250 255

Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu
260 265 270

Gly Pro Asp
275

<210> 109

<211> 733

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión Fc-HRS (fusión Fc C-terminal)

10 <400> 109

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg

ES 2 708 565 T3

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

Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
 485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Asp Lys Thr His Thr Cys
 500 505 510

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 515 520 525

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 530 535 540

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 545 550 555 560

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 565 570 575

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 580 585 590

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 595 600 605

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 610 615 620

ES 2 708 565 T3

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
625 630 635 640

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
645 650 655

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
660 665 670

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
675 680 685

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
690 695 700

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
705 710 715 720

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
725 730

<210> 110

<211> 733

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión Fc-HRS (fusión Fc N-terminal)

10 <400> 110

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

Ser Leu Arg Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met
 355 360 365
 Asn Lys Leu Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg
 370 375 380
 Arg Asp Asn Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln
 385 390 395 400
 Cys Asp Phe Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala
 405 410 415
 Glu Cys Leu Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly
 420 425 430
 Asp Phe Leu Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe
 435 440 445
 Ala Ile Cys Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser
 450 455 460
 Val Asp Lys Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met
 465 470 475 480
 Val Gly Glu Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp
 485 490 495
 Tyr Val Gln Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln
 500 505 510
 Asp Pro Lys Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp
 515 520 525
 Leu Lys Leu Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys
 530 535 540
 Ile Ser Phe Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly
 545 550 555 560
 Val Ile Tyr Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu
 565 570 575
 Glu Pro Leu Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly
 580 585 590
 Leu Val Gly Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly
 595 600 605

ES 2 708 565 T3

Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu
 610 615 620
 Glu Ala Leu Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val
 625 630 635 640
 Ala Ser Ala Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser
 645 650 655
 Glu Leu Trp Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn
 660 665 670
 Pro Lys Leu Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro
 675 680 685
 Leu Val Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys
 690 695 700
 Leu Arg Ser Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp
 705 710 715 720
 Leu Val Glu Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
 725 730

<210> 111
 <211> 1527
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Versión de HRS con optimización de codones

10 <400> 111

atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc 60
 ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa 120
 ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag 180
 ggcacaagag actatagtcc ccggcagatg gcagttcgcg agaaggtgtt tgacgtaatc 240
 atccgttgct tcaagcgcca cgggtgcagaa gtcattgata cacctgtatt tgaactaaag 300
 gaaacactga tgggaaagta tggggaagac tccaagctta tctatgacct gaaggaccag 360
 ggcggggagc tcctgtccct tcgctatgac ctcaactgttc cttttgctcg gtatttggca 420
 atgaataaac tgaccaacat taaacgctac cacatagcaa aggtatatcg gcgggataac 480
 ccagccatga cccgtggcgg ataccgggaa ttctaccagt gtgattttga cattgctggg 540
 aactttgatc ccatgatccc tgatgcagag tgccctgaaga tcatgtgcga gatcctgagt 600

tcacttcaga taggcgactt cctggtcaag gtaaacgatc gacgcattct agatgggatg	660
tttgcctatct gtggtgtttc tgacagcaag ttccgtacca tctgctcctc agtagacaag	720
ctggacaagg tgtcctggga agaggtgaag aatgagatgg tgggagagaa gggccttgca	780
cctgaggtgg ctgaccgcat tggggactat gtccagcaac atggtggggt atccctggtg	840
gaacagctgc tccaggatcc taaactatcc caaaacaagc aggccttggg gggcctggga	900
gacctgaagt tgctctttga gtacctgacc ctattttggca ttgatgacaa aatctccttt	960
gacctgagcc ttgctcgagg gctggattac tacactgggg tgatctatga ggcagtgtctg	1020
ctacagaccc cagcccaggc aggggaagag cccctgggtg tgggcagtgt ggctgctgga	1080
ggacgctatg atgggctagt gggcatgttc gaccccaaag ggcgcaaggt gccatgtgtg	1140
gggctcagca ttgggggtgga gcggtatttc tccatcgtgg aacagagact agaggctttg	1200
gaggagaaga tacggaccac ggagacacag gtgcttgtgg catctgcaca gaagaagctg	1260
ctagaggaaa gactaaagct tgtctcagaa ctgtgggatg ctgggatcaa ggctgagctg	1320
ctgtacaaga agaaccctaaa gctactgaac cagttacagt actgtgagga ggcaggcatc	1380
ccactggtgg ctatcatcgg cgagcaggaa ctcaaggatg gggcatcaa gctccgttca	1440
gtgacgagca ggggaagaggt ggatgtccga agagaagacc ttgtggagga aatcaaaagg	1500
agaacaggcc agcccctctg catctgc	1527

<210> 112

<211> 423

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Versión de HRS con optimización de codones

10 <400> 112

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtgggt	60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa	120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa	180
ggaacccgtg actattctcc tcgtcaaagt gccgtccgtg aaaaagtgtt cgacgtgatc	240
attcgtctgt ttaaaccgca tgggtgccga gtgattgata ccccggtgtt tgagctgaaa	300
gagacactga tgggcaaata tgggtaggac agcaaactga tttatgacct gaaagatcag	360
ggtggtgaac tgctgagtct gcgctatgat ctgacagttc cgtttgcccg ttatctggca	420
atg	423

<210> 113

15 <211> 1224

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Versión de HRS con optimización de codones

20

<400> 113

atggcagaac	gtgccgccct	ggaagagctg	gtaaaactgc	aaggcgagcg	tggtcgtggt	60
ctgaaacagc	agaaagcaag	cgctgaactg	atcgaagaag	aagtggcgaa	actgctgaaa	120
ctgaaagcac	agctgggtcc	tgatgaatca	aaacaaaaat	tcgtcctgaa	aactccgaaa	180
ggaacccgtg	actattctcc	tcgtcaaattg	gccgtccgtg	aaaaagtgtt	cgacgtgatc	240
attcgtgtgt	ttaaagccca	tggtgccgaa	gtgattgata	ccccggtgtt	tgagctgaaa	300
gagacactga	tgggcaaata	tggtgaggac	agcaaactga	tttatgacct	gaaagatcag	360
ggtggtgaac	tgctgagtct	gcgctatgat	ctgacagttc	cgtttgcccc	ttatctggca	420
atgaataaac	tgaccaacat	taaacgctat	cacattgcta	aagtctatcg	ccgtgacaat	480
cctgctatga	cccggtgtcg	ttatcgtgag	ttctatcagt	gtgacttcga	tattgcgggc	540
aactttgatc	cgatgatccc	ggatgctgaa	tgccctgaaa	tcatgtgtga	gatcctgagc	600
agtctgcaga	ttggcgattt	cctggtgaaa	gtcaacgata	gccgtattct	ggatggcatg	660
ttcgccatct	gtggtgttag	cgactccaaa	ttccgtacca	tctgtagtag	tgtggacaaa	720
ctggataaag	tgagctggga	ggaggtgaaa	aacgaaatgg	tgggcgagaa	aggtctggct	780
cctgaagtgg	ctgaccgtat	tggtgattat	gtccagcagc	acgggtggagt	atcactgggt	840
gagcaactgc	tgcaagacct	taaactgagt	cagaataaac	aggccctgga	gggactggga	900
gatctgaaac	tgctgttcga	gtatctgacc	ctgttcggta	togatgacaa	aatctccttt	960
gacctgtcac	tggctcgtgg	actggactat	tataccggcg	tgatctatga	agctgtactg	1020
ctgcaaactc	cagcacaagc	aggtgaagag	cctctgggtg	tggttagtgt	agccgtggg	1080
ggacgttatg	atggactggt	ggggatgttc	gacctaaag	gccgtaaagt	tccgtgtgtg	1140
ggtctgagta	tcggtgttga	gcgtatcttt	tccatcgtcg	agcaacgtct	ggaagcactg	1200
gaggaaaaaa	tccgtacgac	cgaa				1224

5 <210> 114

<211> 339

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Versión de HRS con optimización de codones

<400> 114

atggcagaac	gtgccgccct	ggaagagctg	gtaaaactgc	aaggcgagcg	tggtcgtggt	60
ctgaaacagc	agaaagcaag	cgctgaactg	atcgaagaag	aagtggcgaa	actgctgaaa	120
ctgaaagcac	agctgggtcc	tgatgaatca	aaacaaaaat	tcgtcctgaa	aactccgaaa	180
ggaacccgtg	actattctcc	tcgtcaaattg	gccgtccgtg	aaaaagtgtt	cgacgtgatc	240
attcgtgtgt	ttaaagccca	tggtgccgaa	gtgattgata	ccccggtgtt	tgagctgaaa	300
gagacactga	tgggcaaata	tggtgaggac	agcaaactg			339

15

<210> 115

<211> 180

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Versión de HRS con optimización de codones

<400> 115

10

atggcagAAC	gtgccgccct	ggaagagctg	gtaaaactgc	aaggcgagcg	tgttcgtggt	60
ctgaaacagc	agaaagcaag	cgctgaactg	atcgaagaag	aagtggcgaa	actgctgaaa	120
ctgaaagcac	agctgggtcc	tgatgaatca	aaacaaaaat	tcgtcctgaa	aactccgaag	180

<210> 116

<211> 1518

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Versión de HRS con optimización de codones

20 <400> 116

atggcagagc	gtcgggcgct	ggaggagctg	gtgaaacttc	agggagagcg	cgtagcagggc	60
ctcaagcagc	agaaggccag	cgccgagctg	atcgaggagg	aggtggcgaa	actcctgaaa	120
ctgaaggcac	agctgggtcc	tgatgaaagc	aaacagaaat	ttgtgctcaa	aacccccaa	180
ggcacaagag	actatagtcc	ccggcagatg	gcagttcgcg	agaaggtgtt	tgacgtaatc	240
atccgttgct	tcaagcgcca	cggtgcagaa	gtcattgata	cacctgtatt	tgaactaaag	300
gaaacactga	tgggaaagta	tggggaagac	tccaagctta	tctatgacct	gaaggaccag	360
ggcggggagc	tcctgtccct	tcgctatgac	ctcaactgttc	cttttgctcg	gtatttggca	420
atgaataaac	tgaccaacat	taaacgctac	cacatagcaa	aggtatatcg	gcgggataac	480
ccagccatga	cccgtaggag	ataccgggaa	ttctaccagt	gtgattttga	cattgctggg	540
aactttgatc	ccatgatccc	tgatgcagag	tgctgaaga	tcattgtcga	gatcctgagt	600
tcacttcaga	taggcgactt	cctggtcaag	gtaaacgata	gacgcattct	agatgggatg	660
tttgctatct	gtggtgtttc	tgacagcaag	ttccgtacca	tctgctcctc	agtagacaag	720
ctggacaagg	tgctctggga	agaggtgaag	aatgagatgg	tgggagagaa	gggccttgca	780
cctgaggtgg	ctgaccgcat	tggggactat	gtccagcaac	atgggtgggt	atccctgggt	840
gaacagctgc	tccaggatcc	taaactatcc	caaaacaagc	aggccttgga	gggcctggga	900
gacctgaagt	tgctctttga	gtacctgacc	ctatttggca	ttgatgacaa	aatctccttt	960

gacctgagcc ttgctcgagg gctggattac tacactgggg tgatctatga ggcagtgtctg 1020
ctacagaccc cagcccaggc aggggaagag cccctgggtg tgggcagtgt ggctgtctgga 1080
ggacgctatg atgggctagt gggcatgttc gaccccaaag ggcgcaaggt gccatgtgtg 1140
gggctcagca ttgggggtgga gcggtatttc tccatcgttg aacagagact agaggctttg 1200
gaggagaaga tacggaccac ggagacacag gtgcttgttg catctgcaca gaagaagctg 1260
ctagaggaaa gactaaagct tgtctcagaa ctgtgggatg ctgggatcaa ggctgagctg 1320
ctgtacaaga agaaccctaa gctactgaac cagttacagt actgtgagga ggcaggcatc 1380
ccactgggtg ctatcatcgg cgagcaggaa ctcaaggatg gggcatcaa gctccgttca 1440
gtgacgagca gggaagaggt ggatgtccga agagaagacc ttgtggagga aatcaaaagg 1500
agaacaggcc agcccctc 1518

<210> 117

<211> 144

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Versión de HRS con optimización de codones

10 <400> 117

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt 60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa 120
ctgaaagcac agctgggtcc tgat 144

<210> 118

15 <211> 429

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Versión de HRS con optimización de codones

20

<400> 118

tgccctgaaaa tcatgtgtga gatcctgagt agtctgcaaa ttggcgactt tctggtcaaa 60
gtgaacgata gccgtattct ggatggcatg ttccgcatct gtggtgttag cgactccaaa 120
ttccgtacaa tctgtagcag cgtggacaaa ctggataaag tgtcctggga agagggtgaaa 180
aacgaaatgg tgggtgaaaa aggtctggct ccggagggtg ctgaccgtat cgggtgattat 240
gttcagcagc acggcggtgt tagtctgggt gaacaactgc tgcaagacct gaaactgtct 300
cagaacaaac aggccctgga aggactggga gatctgaaac tgctgttcga gtatctgacg 360
ctgttcggca ttgatgacaa aatttctttc gacctgtcac tggcacgtgg actggactat 420
tataccggt 429

25 <210> 119

<211> 315

<212> ADN

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Versión de HRS con optimización de codones

5 <400> 119

```
cgtaccaccg aaacccaagt tctggttgcc tcagctcaga aaaaactgct ggaagaacgc      60
ctgaaactgg ttagcgaaact gtgggatgct ggcattaaag ccgaactgct gtataaaaaa    120
aaccggaaac tgctgaatca gctgcagtat tgtgaggaag cgggtattcc tctggtggcc    180
attatcggag aacaggaact gaaagacggc gttattaaac tgcgtagcgt gacctctcgt    240
gaagaagttg acgttcgccg tgaagatctg gtcgaggaag tcaaactgctg taccggtcaa    300
cctctgtgta tttgc                                     315
```

<210> 120

10 <211> 810

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Versión de HRS con optimización de codones

15

<400> 120

```
atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt      60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa    120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa    180
ggaacccgtg actattctcc tcgtcaaatg gccgtccgtg aaaaagtgtt cgacgtgatc    240
attcgtctgct ttaaaccgca tgggtgccga gtgattgata ccccggtgtt tgagctgaaa    300
gagacactga tgggcaaata tgggtgaggac agcaaactga tctatgacct gaaagaccaa    360
ggcgggtgaac tgctgtccct gcgttatgat ctgactgtgc cgtttgcccg ttatctggcc    420
atgaataaac tgacgaacat taaacgctat cacattgcc aagtgtatcg ccgtgacaat    480
cctgctatga ctcgtggacg ttatcgtgaa ttctatcagt gtgacttcga tattgccggc    540
aacttcgacc ctatgattcc ggatgctgaa tgccctgaaa tcatgtgtga gatcctgagc    600
agcctgcaaa ttggtgactt cctggtgaaa gtgaatgacc gtcgtatcct ggatggcatg    660
tttgccattt gtggtgtgag cgattccaaa ttccgtacca tctgtagtag tgtggacaaa    720
ctggataaag tgggctatcc gtggtggaac tctttagacc gtattctgaa ctatcctaaa    780
accagccgcc cgtggcgtgc ttgggaaact                                     810
```

20 <210> 121

<211> 1185

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Versión de HRS con optimización de codones

<400> 121

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt	60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa	120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa	180
gacttcgata ttgccgggaa ttttgaccct atgatccctg atgccgaatg tctgaaaatc	240
atgtgtgaga tcctgagcag tctgcagatt ggtgacttcc tggtgaaagt gaacgatcgc	300
cgtattcttg atggaatgtt tgccatttgt ggcgtgtctg acagcaaatt tcgtacgatc	360
tgtagcagcg tggataaaact ggataaagtg agctgggagg aggtgaaaaa tgagatggtg	420
ggcgaaaaag gtctggcacc tgaagtggct gaccgtatcg gtgattatgt tcagcaacat	480
ggcgtgtttt ctctggtcga acagctgctg caagacccaa aactgagcca gaacaaacag	540
gcactggaag gactgggtga tctgaaactg ctgtttgagt atctgacgct gtttggcatc	600
gatgacaaaa tctcgtttga cctgagcctg gcacgtggtc tggattatta taccggcgtg	660
atctatgaag ccgtcctgct gcaaactcca gcacaagcag gtgaagaacc tctgggtgtt	720
ggtagtgtag cggcaggcgg acgttatgat ggactgggtg ggatgtttga tccgaaaggc	780
cgtaaagttc cgtgtgtcgg tctgagtatc ggggttgagc gtatctttag cattgtggag	840
caacgtctgg aagctctgga ggaaaaaatc cgtaccaccg aaaccaagt tctggttgcc	900
tcagctcaga aaaaactgct ggaagaacgc ctgaaactgg ttagcgaact gtgggatgct	960
ggcattaaag ccgaactgct gtataaaaaa aaccggaaac tgctgaatca gctgcagtat	1020
tgtgaggaag cgggtattcc tctggtggcc attatcggag aacaggaact gaaagacggc	1080
gttattaaac tgcttagcgt gacctctcgt gaagaagttg acgttcgccg tgaagatctg	1140
gtcgaggaaa tcaaacgtcg taccggtcaa cctctgtgta tttgc	1185

<210> 122

5 <211> 1077

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Versión de HRS con optimización de codones

10

<400> 122

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt	60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa	120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa	180

ES 2 708 565 T3

gtgaatgatc gccgtatcct ggatggcatg tttgccattt gtggtgtgag cgactogaaa	240
ttccgtacga tttgctctag cgtcgataaa ctggacaaaag tgccttgga agaggtgaaa	300
aacgagatgg tgggtgagaa aggtctggct cctgaagttg ccgaccgtat tgggtattat	360
gttcagcagc atggcggtgt ttcactggtt gaacaactgc tgcaagaccc gaaactgtct	420
cagaataaac aggcgctgga aggactggga gatctgaaac tgctgtttga gtatctgacc	480
ctgttcggca ttgatgacaa aatcagcttc gacctgagcc tggcacgtgg tctggattat	540
tataccggcg tgatctatga agccgttctg ctgcagacac cagcacaagc aggcgaagaa	600
cctctgggtg ttggttctgt ggcagccggt ggtcgttatg atggactggt aggcattgtc	660
gatccgaaag gccgtaaagt tccgtgtgtg ggactgagta tcggtgttga gcgtatcttt	720
agcatcgtgg aacaacgtct ggaagcgtg gaggagaaaa ttcgtaccac cgaaacccaa	780
gttctggttg cctcagctca gaaaaaactg ctggaagaac gcctgaaact ggttagcgaa	840
ctgtgggatg ctggcattaa agccgaactg ctgtataaaa aaaacccgaa actgctgaat	900
cagctgcagt attgtgagga agcgggtatt cctctggtgg ccattatcgg agaacaggaa	960
ctgaaagacg gcgttattaa actgcgtagc gtgacctctc gtgaagaagt tgacgttcgc	1020
cgtgaagatc tggctgagga aatcaaacgt cgtaccggtc aacctctgtg tatttgc	1077

<210> 123

<211> 1197

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Versión de HRS con optimización de codones

10 <400> 123

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt	60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa	120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa	180
ggaactcgtg attatagccc tcgccagatg gctgtccgtg aaaaagtgtt cgatgtgatc	240
attcgtgct tcaaacgtca tgggtccgaa gtcattgata ccccggtgtt cgagctgaaa	300
gtgaacgatc gccgtattct ggatggcatg ttcgccattt gtggtgttag cgatagcaaa	360
ttccgtacaa tctgctctag cgtggacaaa ctggacaaaag tgagctggga agaggtgaaa	420
aacgagatgg tgggtgagaa aggcctggct cctgaagttg ccgaccgtat cggagattat	480
gttcagcagc atggcggtgt ttcactggtt gaacaactgc tgcaagaccc gaaactgtct	540
cagaacaaac aggcactgga aggtctggga gatctgaaac tgctgttcga gtatctgacg	600
ctgttcggta ttgacgacaa aatttccttc gacctgtcgc tggcacgtgg tctggattat	660
tatacaggcg tgatctatga ggctgtactg ctgcagacac cagcacaagc aggtgaagag	720

ES 2 708 565 T3

```
cctctgggtg ttggttcagt tgctgccggt ggacgttatg acggactggt agggatgttt 780
gacccaaaag gccgtaaagt cccgtgtgta ggactgtcta ttggcgttga gcgtatcttt 840
agcatcgtgg agcaacgtct ggaagctctg gaggagaaaa tccgtaccac cgaaacccaa 900
gttctgggtg cctcagctca gaaaaaactg ctggaagaac gcctgaaact ggtagcgaa 960
ctgtgggatg ctggcattaa agccgaactg ctgtataaaa aaaaccgaa actgctgaat 1020
cagctgcagt attgtgagga agcgggtatt cctctgggtg ccattatcgg agaacaggaa 1080
ctgaaagacg gcgttattaa actgcgtagc gtgacctctc gtgaagaagt tgacgttcgc 1140
cgtgaagatc tggtcgagga aatcaaacgt cgtaccggtc aacctctgtg tatttgc 1197
```

<210> 124

<211> 1419

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Versión de HRS con optimización de codones

10 <400> 124

```
atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt 60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa 120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa 180
ggaactcgtg attatagccc tcgccagatg gctgtccgtg aaaaagtgtt cgatgtgatc 240
attcgtctgt tcaaactgca tgggtccgaa gtcattgata ccccggtgtt cgagctgaaa 300
gaaaccctga tgggcaaata tggggaagat tccaaactga totatgacct gaaagaccag 360
ggaggtgaac tgctgtctct gcgctatgac ctgactgttc cttttgctcg ctatctggcc 420
atgaataaac tgaccaacat caaacgctat catatcgcca aagtgtatcg ccgtgacaat 480
ccagcaatga cccgtggtcg ttatcgtgaa ttttatcagt gtgtgaacga tcgccgtatt 540
ctggacggca tgttcgccat ttgtggtgtg tctgactcca aatttcgtac gatctgtca 600
agcgtggaca aactggacaa agtgagctgg gaagaggtga aaaacgagat ggtgggtgag 660
aaaggcctgg ctctgaaagt tgccgaccgt atcggagatt atgttcagca gcatggcgga 720
gtttcactgg ttgaacaact gctgcaagac ccgaaactgt cacagaacaa acaggcactg 780
gaaggtctgg gggatctgaa actgctgttc gagtatctga cgctgttcgg tattgacgac 840
aaaatcagct tcgatctgag cctggcacgt ggtctggact attataccgg cgtgatttat 900
gaagccgttc tgctgcagac tccagcacia gcaggtgaag agcctctggg tgttgaagt 960
gtggcagccg gtggccgtta tgatggtctg gttggcatgt ttgaccgaa aggccgtaaa 1020
gtcccgtgtg taggactgtc tatcggcgtg gagcgtatct ttagcatcgt ggaacaacgc 1080
```

ES 2 708 565 T3

ctggaagctc tggaagagaa aatccgtacc accgaaaccc aagttctggt tgcctcagct	1140
cagaaaaaac tgctggaaga acgcctgaaa ctggttagcg aactgtggga tgctggcatt	1200
aaagccgaac tgctgtataa aaaaaacccg aaactgctga atcagctgca gtattgtgag	1260
gaagcgggta ttctctggt gccattatc ggagaacagg aactgaaaga cggcgttatt	1320
aaactgcgta gcgtgacctc tcgtgaagaa gttgacgttc gccgtgaaga tctggtcgag	1380
gaaatcaaac gtcgtaccgg tcaacctctg tgtatttgc	1419

<210> 125

<211> 1407

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Versión de HRS con optimización de codones

10 <400> 125

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt	60
ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa	120
ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa	180
gaaaccctga tgggcaaata tggcgaagat tccaaactga tctatgacct gaaagaccaa	240
ggcgggtgaac tgctgtccct gcgttatgac ctgactgttc cgtttgctcg ttatctggcc	300
atgaataaac tgaccaacat taaacgctat cacattgcc aagtgtatcg ccgtgacaat	360
cctgctatga ctctgggacg ttatcgtgaa ttctatcagt gtgacttcga tattgccggc	420
aacttcgacc ctatgattcc ggatgctgaa tgctgaaaa tcatgtgtga gatcctgagc	480
agcctgcaaa ttggtgactt cctggtgaaa gtgaatgacc gtcgtatcct ggatggcatg	540
ttcgccattt gtggtgtag cgattccaaa ttccgtacca tctgtagtag tgtggacaaa	600
ctggataaag tgagctggga agagtgaaa aacgaaatgg tgggcgaaaa aggtctggca	660
cctgaggttg ctgatcgtat cggtgactat gtccagcagc atggaggtgt ttactcggtt	720
gagcaactgc tgcaagatcc gaaactgtct cagaacaaac aggccttgga aggactgggt	780
gatctgaaac tgctgttcga gtatctgacg ctgttcggta ttgatgacaa aatctcgttc	840
gacctgtctc tggctcgtgg actggattat tatacgggcg taatctatga agctgtcctg	900
ctgcagacac cagcacaagc aggtgaagag cctctgggtg ttggaagtgt tgctgccggt	960
ggtcgctatg acggactggg tggcatgttc gatccgaaag gccgtaaagt tccgtgtgta	1020
ggactgagca ttggcgttga gcgtatcttt tccatcgttg agcaacgtct ggaagcactg	1080
gaagagaaaa tccgtaccac cgaaacccaa gttctggttg cctcagctca gaaaaaactg	1140
ctggaagaac gcctgaaact ggtagcgaa ctgtgggatg ctggcattaa agccgaactg	1200
ctgtataaaa aaaacccgaa actgctgaat cagctgcagt attgtgagga agcgggtatt	1260

ES 2 708 565 T3

cctctggtgg ccattatcgg agaacaggaa ctgaaagacg gcgttattaa actgcgtagc 1320
 gtgacctctc gtgaagaagt tgacgttcgc cgtgaagatc tggtcgagga aatcaaacgt 1380
 cgtaccggtc aacctctgtg tatttgc 1407

<210> 126
 <211> 1305
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Versión de HRS con optimización de codones

10 <400> 126

atggcagaac gtgccgccct ggaagagctg gtaaaactgc aaggcgagcg tgttcgtggt 60
 ctgaaacagc agaaagcaag cgctgaactg atcgaagaag aagtggcgaa actgctgaaa 120
 ctgaaagcac agctgggtcc tgatgaatca aaacaaaaat tcgtcctgaa aactccgaaa 180
 ggaactcgtg attatagccc tcgccagatg gctgtccgtg aaaaagtgtt cgatgtgatc 240
 attcgtctgt tcaaactgca tgggtgccga gtcattgata ccccggtgtt cgagctgaaa 300
 gatttcgata ttgccggcaa ctttgatccg atgattccgg atgctgagtg tctgaaaatc 360
 atgtgtgaga tcctgagtag tctgcagatt ggggatttcc tggtgaaagt gaacgatcgc 420
 cgtattcttg acggcatgtt tgccatttgt ggcgttagcg atagcaaatt ccgtaccgatc 480
 tgtagcagtg tgacaaaact ggataaagtc tcttggaag aggtcaaaaa cgagatggtt 540
 ggtgagaaaag gcctggctcc tgaagtggct gaccgtattg gtgattatgt ccagcagcat 600
 ggtggtgttt cactggttga acaactgctg caagaccga aactgtctca gaacaaacag 660
 gcactggaag gtctgggtga tctgaaactg ctgttcgagt atctgacgct gttcggattt 720
 gacgacaaaa tttccttcga cctgtcactg gcacgtggtc tggattatta tacaggcgta 780
 atctatgagg ctgtactgct gcaaaactca gcacaagcag gtgaagaacc tctgggagtt 840
 ggtagtgtag cggcaggggg tcgttatgat gggctggtcg ggatgttcga tccaaaaggc 900
 cgtaaagtcc cgtgtgttgg tctgtctatt ggcgttgagc gtatcttctc catcgtggag 960
 caacgtctgg aagctctgga agaaaaaatc cgtaccaccg aaaccaagt tctggttgcc 1020
 tcagctcaga aaaaactgct ggaagaacgc ctgaaactgg ttagcgaact gtgggatgct 1080
 ggcattaaag ccgaactgct gtataaaaaa aacccgaaac tgctgaatca gctgcagtat 1140
 tgtgaggaag cgggtattcc tctggtggcc attatcggag aacaggaact gaaagacggc 1200
 gttattaaac tgcgtagcgt gacctctcgt gaagaagttg acgttcgccg tgaagatctg 1260
 gtcgaggaaa tcaaactcgc taccgggtcaa cctctgtgta tttgc 1305

<210> 127
 15 <211> 423
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Versión de HRS con optimización de codones

```

                                <400> 127
atgttcgacc caaaaggccg taaagttccg tgtgtagggc tgtctatcgg tgttgagcgt      60
atcttctcca tcgttgagca gcgtctggaa gcactggagg aaaaaatccg tacgaccgag      120
actcaagtcc tggttgctag tgcccagaaa aaactgctgg aagagcgccct gaaactgggt      180
agtgagctgt gggatgccgg tattaagcc gaactgctgt ataaaaaaaa cccgaaactg      240
ctgaatcagc tgcagtattg tgaagaagcg ggcattccgc tggtagcgat tatcggggaa      300
caagaactga aagatggcgt gatcaaactg cgtagcgta caagccgtga ggaagtggac      360
gtccgccgtg aggatctggt tgaagagatt aaacgccgta caggtcagcc tctgtgtatt      420
tgc                                                                    423

```

5

<210> 128
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(19)
 <223> Región bisagra de IgA1 humana

15

<400> 128

```

Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro
1           5           10          15

```

Ser Pro Ser

20 <210> 129

<211> 101
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(101)
 <223> Región CH2 de IgA1 humana

30 <400> 129

```

Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu
1           5           10          15

```

```

Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg
    20                      25                      30

Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser
    35                      40                      45

Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val
    50                      55                      60

Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr
    65                      70                      75                      80

Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala
    85                      90                      95

Thr Leu Ser Lys Ser
    100

```

<210> 130

<211> 131

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(131)

<223> región CH3 de IgA1 humana

<400> 130

```

Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu
1      5      10      15

Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly
    20      25      30

Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu
    35      40      45

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

Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala
65      70      75      80

Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu
    85      90      95

Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly
15      100      105      110

```

ES 2 708 565 T3

Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly
115 120 125

Thr Cys Tyr
130

<210> 131

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(6)

<223> región bisagra de IgA2 humana

<400> 131

Val Pro Pro Pro Pro Pro
1 5

15

<210> 132

<211> 101

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(101)

25 <223> CH2 de IgA2 humana

<400> 132

Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu
1 5 10 15

Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg
20 25 30

Asp Ala Ser Gly Ala Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser
35 40 45

Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val
50 55 60

Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Gln Pro Trp Asn His Gly Glu Thr
65 70 75 80

Phe Thr Cys Thr Ala Ala His Pro Glu Leu Lys Thr Pro Leu Thr Ala
85 90 95

30

Asn Ile Thr Lys Ser
100

<210> 133

<211> 131

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (1)..(131)

<223> región CH3 de IgA2 humana

<400> 133

Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly
20 25 30

Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu
35 40 45

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

Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala
65 70 75 80

Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu
85 90 95

Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly
100 105 110

Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly
115 120 125

Thr Cys Tyr
130

10

<210> 134

<211> 58

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(58)

20 <223> región bisagra de IgD humana

<400> 134

ES 2 708 565 T3

Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala Gln Pro Gln
1 5 10 15

Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg
20 25 30

Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu
35 40 45

Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro
50 55

<210> 135

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(108)

<223> región CH2 de IgD humana

<400> 135

Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro
1 5 10 15

Ala Val Gln Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe
20 25 30

Val Val Gly Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala
35 40 45

Gly Lys Val Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His
50 55 60

Ser Asn Gly Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser
65 70 75 80

Leu Trp Asn Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser
85 90 95

Leu Pro Pro Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro
100 105

15

<210> 136

<211> 117

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(117)

25 <223> región CH3 de IgD humana

ES 2 708 565 T3

<400> 136

[illegible]

5

<210> 137
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> región CH2 de IgE humana

15

<400> 137

Val Cys Ser Arg Asp Phe Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser
1 5 10 15

Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys
20 25 30

ES 2 708 565 T3

Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu
35 40 45

Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln
50 55 60

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

His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly
85 90 95

His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala
100 105

<210> 138

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(108)

<223> región CH3 de IgE humana

<400> 138

Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro Ser Pro
1 5 10 15

Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu Val Val
20 25 30

Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala
35 40 45

Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys Gln Arg
50 55 60

Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr Arg Asp
65 70 75 80

Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro His Leu
85 90 95

Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser
100 105

15

<210> 139

<211> 110

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(110)

<223> región CH4 de IgE humana

5 <400> 139

```

Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp
1          5          10          15

Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe
          20          25          30

Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu
          35          40          45

Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser
          50          55          60

Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu
65          70          75          80

Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro
          85          90          95

Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
          100          105          110

```

<210> 140

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(15)

<223> región bisagra de IgG1 humana

<400> 140

20

```

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1          5          10          15

```

<210> 141

<211> 110

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

30 <222> (1)..(110)

<223> región CH2 de IgG1 humana

<400> 141

ES 2 708 565 T3

```

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1          5          10          15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
          20          25          30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
          35          40          45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
          50          55          60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65          70          75          80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
          85          90          95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
          100          105          110

```

<210> 142

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(107)

<223> región CH3 de IgG1 humana

<400> 142

```

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1          5          10          15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
          20          25          30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
          35          40          45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
          50          55          60

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
          85          90          95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          100          105

```

15

<210> 143

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(12)

10 <223> región bisagra de IgG2 humana

<400> 143

Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
1				5					10		

15 <210> 144

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(109)

<223> región CH2 de IgG2 humana

25 <400> 144

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

Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
			20					25					30		

Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
		35					40					45			

Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
	50					55					60				

Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln
65					70					75				80	

Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly
				85					90					95	

Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys
			100					105				

30

<210> 145

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> región CH3 de IgG2 humana

ES 2 708 565 T3

<400> 145

```

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1          5          10          15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
          20          25          30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
          35          40          45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50          55          60

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
          85          90          95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          100          105

```

5

<210> 146
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(62)
 <223> región bisagra de IgG3 humana

15

<400> 146

```

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1          5          10          15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
          20          25          30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
          35          40          45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
          50          55          60

```

20

<210> 147
 <211> 110
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(110)

<223> región CH2 de IgG3 humana

5

<400> 147

```

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1          5          10          15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
          20          25          30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
          35          40          45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50          55          60

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65          70          75          80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
          85          90          95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
          100          105          110

```

10 <210> 148

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> región CH3 de IgG3 humana

20 <400> 148

ES 2 708 565 T3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

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

Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 149

<211> 12

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(12)

<223> región bisagra de IgG4 humana

<400> 149

15 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

<210> 150

<211> 110

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(110)

25 <223> región CH2 de IgG4 humana

<400> 150

ES 2 708 565 T3

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105 110

<210> 151

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(107)

<223> región CH3 de IgG4

<400> 151

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

15

ES 2 708 565 T3

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
100 105

<210> 152
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
10 <222> (1)..(112)
<223> región CH2 de IgM humana

<400> 152

Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg
1 5 10 15

Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala
20 25 30

Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly
35 40 45

Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala
50 55 60

Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp
85 90 95

His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro
15 100 105 110

<210> 153
<211> 106
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(106)
25 <223> región CH3 de IgM humana

<400> 153

Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala
1 5 10 15

30

ES 2 708 565 T3

Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp
20 25 30

Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly
35 40 45

Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala
50 55 60

Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn
65 70 75 80

Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser
85 90 95

Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys
100 105

<210> 154

<211> 131

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(131)

<223> región CH4 de IgM humana

<400> 154

Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg
1 5 10 15

Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr
20 25 30

Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln
35 40 45

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

Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu
65 70 75 80

Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu
85 90 95

15

ES 2 708 565 T3

Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly
100 105 110

Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly
115 120 125

Thr Cys Tyr
130

<210> 155

<211> 230

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fc variante

<220>

10 <221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es Ala o ausente

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (16)..(16)

<223> Xaa es Pro o Glu

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)..(17)

20 <223> Xaa es Phe, Val o Ala

<220>

<221> VARIANTE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa es Leu, Glu o Ala

25 <220>

<221> VARIANTE

<222> (80)..(80)

<223> Xaa es Asn o Ala

<220>

30 <221> VARIANTE

<222> (230)..(230)

<223> Xaa es Lys o ausente

<400> 155

35

Xaa Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
20 25 30

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
35 40 45

ES 2 708 565 T3

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
50 55 60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Xaa
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
85 90 95

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
100 105 110

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
115 120 125

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
130 135 140

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
145 150 155 160

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
165 170 175

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
180 185 190

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
195 200 205

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
225 230

<210> 156

<211> 209

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu
1 5 10 15

Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp
20 25 30

10

ES 2 708 565 T3

Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala
35 40 45

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

Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe
65 70 75 80

Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr
85 90 95

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

Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys
115 120 125

Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln
130 135 140

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

Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu
165 170 175

Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met
180 185 190

Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp
195 200 205

Arg

<210> 157

<211> 209

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 157

Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu
1 5 10 15

Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp
20 25 30

10

ES 2 708 565 T3

Ala Ser Gly Ala Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala
35 40 45

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

Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Gln Pro Trp Asn His Gly Glu Thr Phe
65 70 75 80

Thr Cys Thr Ala Ala His Pro Glu Leu Lys Thr Pro Leu Thr Ala Asn
85 90 95

Ile Thr Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro
100 105 110

Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys
115 120 125

Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln
130 135 140

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

Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu
165 170 175

Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met
180 185 190

Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp
195 200 205

Arg

<210> 158

<211> 212

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158

Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe
1 5 10 15

Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr
20 25 30

10

ES 2 708 565 T3

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

<210> 159

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 159

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

10

ES 2 708 565 T3

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

<210> 160

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 160

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

10

ES 2 708 565 T3

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

<210> 161

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 161

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

10

ES 2 708 565 T3

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 65 70 75 80
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 85 90 95
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 100 105 110
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 115 120 125
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 130 135 140
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 145 150 155 160
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 165 170 175
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 180 185 190
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 195 200 205

<210> 162

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (80)..(80)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (90)..(90)

15 <223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (103)..(103)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> (105)..(105)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

25 <221> VARIANTE

<222> (181)..(181)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 162

30

ES 2 708 565 T3

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

<210> 163

<211> 210

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 163

ES 2 708 565 T3

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

Ser Val

210

5 <210> 164

<211> 15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 164

aaacaaaaca aaaca 15

<210> 165

<211> 10

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

ES 2 708 565 T3

```

<400> 165
aaacaaaaca      10
5
<210> 166
<211> 10
<212> ADN
<213> Homo sapiens
10
<400> 166
caaaacaaaa      10
15
<210> 167
<211> 15
<212> ADN
<213> Homo sapiens
20
<400> 167
caaaacaaaa caaaa      15
<210> 168
25
<211> 10
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 168
30
aaacaaaaca      10
<210> 169
<211> 10
35
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 169
acaaaacaaa      10
40
<210> 170
<211> 500
<212> PRT
<213> Homo sapiens
45
<400> 170
Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1          5          10          15
Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu

```

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

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

<210> 171
 <211> 501
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 171

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
 245 250 255
 Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 450 455 460
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 465 470 475 480
 Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
 485 490 495
 Glu Ile Lys Arg Arg
 500

ES 2 708 565 T3

<211> 502
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 172

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1          5          10          15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35          40          45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65          70          75          80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
          85          90          95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
          100          105          110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
          115          120          125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
          130          135          140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145          150          155          160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
          165          170          175

Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
          180          185          190

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
          195          200          205

```


ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr
500

<210> 173

<211> 503

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 173

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Ile Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130 135 140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145 150 155 160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe

10

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly
500

<210> 174

<211> 504

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 174

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

10

ES 2 708 565 T3

Tyr	Asp	Leu	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Leu	130	135	140
Thr	Asn	Ile	Lys	Arg	Tyr	His	Ile	Ala	Lys	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Asn	145	150	155
Pro	Ala	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gln	Cys	Asp	Phe	165	170	175
Asp	Ile	Ala	Gly	Asn	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu	180	185	190
Lys	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	195	200	205
Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	210	215	220
Gly	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	225	230	235
Leu	Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu	245	250	255
Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln	260	265	270
Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys	275	280	285
Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	290	295	300
Leu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Lys	Ile	Ser	Phe	305	310	315
Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Val	Ile	Tyr	325	330	335
Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Gln	Ala	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu	340	345	350
Gly	Val	Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Arg	Tyr	Asp	Gly	Leu	Val	Gly	355	360	365
Met	Phe	Asp	Pro	Lys	Gly	Arg	Lys	Val	Pro	Cys	Val	Gly	Leu	Ser	Ile	370	375	380

ES 2 708 565 T3

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
385 390 395 400

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
405 410 415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln
500

<210> 175

<211> 505

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 175

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

10

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
355 360 365

Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
370 375 380

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
385 390 395 400

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
405 410 415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro
500 505

<210> 176

<211> 507

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 176

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

10

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

```

305                      310                      315                      320

Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
      325                      330                      335

Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
      340                      345                      350

Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
      355                      360                      365

Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
      370                      375                      380

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
385                      390                      395                      400

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
      405                      410                      415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
      420                      425                      430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
      435                      440                      445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450                      455                      460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465                      470                      475                      480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
      485                      490                      495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys
      500                      505

```

<210> 177

<211> 508

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 177

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1                      5                      10                      15

```

10

```

Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu

```

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

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

<210> 178

<211> 509

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 178

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
 245 250 255
 Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 450 455 460
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 465 470 475 480
 Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
 485 490 495
 Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys
 500 505

<211> 61
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

5 <223> Polipéptido HRS modificado con cisteína

<400> 179

Met Cys Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly
 1 5 10 15

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

Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro
 35 40 45

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

10

<210> 180
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido HRS modificado con cisteína

<400> 180

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
 50 55 60

20

<210> 181
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido HRS modificado con cisteína

<400> 181

30

ES 2 708 565 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Cys
50 55 60

<210> 182

<211> 183

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica HRS modificado con cisteína

10 <400> 182

atgtgtgcag aaagagccgc cctggaagag ttagttaagt tgcaaggtga acgtgtccgt 60
ggtctgaagc agcagaaggc tagcgcgag ctgatcgaag aagaggtggc caaactgctg 120
aagctgaagg cgcagctggg cccggacgag agcaaacaaa agttcgtcct gaaaaccccg 180
aaa 183

<210> 183

15 <211> 180

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica HRS modificado con cisteína

20

<400> 183

atggcagaac gtgcggcatt ggaagaattg gttaaactgc aaggtgaacg tggtcgtggt 60
ctgaagcagc agaagtgcag cgcggagctg atcgaagaag aggtggccaa actgctgaag 120
ctgaaggcgc agctgggccc ggacgagagc aaacaaaagt tcgtcctgaa aaccccgaaa 180

25 <210> 184

<211> 183

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Polinucleótido que codifica HRS modificado con cisteína

<400> 184

atggcagaac gtgcggcatt ggaagaattg gttaaactgc aaggtgaacg tggtcgtggt 60
ctgaagcagc agaaggctag cgcggagctg atcgaagaag aggtggccaa actgctgaag 120
ctgaaggcgc agctgggccc ggacgagagc aaacaaaagt tcgtcctgaa aaccccgaaa 180
tgc 183

<210> 185

<211> 506

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido HRS mutado con cisteína

<400> 185

10

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1                               10                      15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35                      40                      45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65                               70                      75                      80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
                85                      90                      95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
          100                      105                      110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115                      120                      125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130                      135                      140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145                      150                      155                      160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Ala Asp Phe
                165                      170                      175

```

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
500 505

<210> 186

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido HRS mutado con cisteína

10 <400> 186

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

ES 2 708 565 T3

Tyr	Asp	Leu	Thr	Val	Pro	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Leu	130	135	140
Thr	Asn	Ile	Lys	Arg	Tyr	His	Ile	Ala	Lys	Val	Tyr	Arg	Arg	Asp	Asn	145	150	155
Pro	Ala	Met	Thr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Arg	Glu	Phe	Tyr	Gln	Val	Asp	Phe	165	170	175
Asp	Ile	Ala	Gly	Asn	Phe	Asp	Pro	Met	Ile	Pro	Asp	Ala	Glu	Cys	Leu	180	185	190
Lys	Ile	Met	Cys	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Asp	Phe	Leu	195	200	205
Val	Lys	Val	Asn	Asp	Arg	Arg	Ile	Leu	Asp	Gly	Met	Phe	Ala	Ile	Cys	210	215	220
Gly	Val	Ser	Asp	Ser	Lys	Phe	Arg	Thr	Ile	Cys	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	225	230	235
Leu	Asp	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Asn	Glu	Met	Val	Gly	Glu	245	250	255
Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Gln	260	265	270
Gln	His	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Lys	275	280	285
Leu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	290	295	300
Leu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Thr	Leu	Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Lys	Ile	Ser	Phe	305	310	315
Asp	Leu	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Val	Ile	Tyr	325	330	335
Glu	Ala	Val	Leu	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Gln	Ala	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu	340	345	350
Gly	Val	Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Arg	Tyr	Asp	Gly	Leu	Val	Gly	355	360	365
Met	Phe	Asp	Pro	Lys	Gly	Arg	Lys	Val	Pro	Cys	Val	Gly	Leu	Ser	Ile	370	375	380

ES 2 708 565 T3

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
385 390 395 400

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
405 410 415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
500 505

<210> 187

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido HRS mutado con cisteína

10 <400> 187

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

ES 2 708 565 T3

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130 135 140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145 150 155 160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
165 170 175

Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Ala Leu
180 185 190

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
195 200 205

Val Lys Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys
210 215 220

Gly Val Ser Asp Ser Lys Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
225 230 235 240

Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
245 250 255

Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
260 265 270

Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
275 280 285

Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
290 295 300

Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
305 310 315 320

Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
325 330 335

ES 2 708 565 T3

Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
340 345 350

Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
355 360 365

Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
370 375 380

Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
385 390 395 400

Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
405 410 415

Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
420 425 430

Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
500 505

<210> 188

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido HRS mutado con cisteína

10 <400> 188

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

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

<210> 189

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido HRS mutado con cisteína

10 <400> 189

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

Leu Asp Lys Val Ser Trp Glu Glu Val Lys Asn Glu Met Val Gly Glu
 245 250 255
 Lys Gly Leu Ala Pro Glu Val Ala Asp Arg Ile Gly Asp Tyr Val Gln
 260 265 270
 Gln His Gly Gly Val Ser Leu Val Glu Gln Leu Leu Gln Asp Pro Lys
 275 280 285
 Leu Ser Gln Asn Lys Gln Ala Leu Glu Gly Leu Gly Asp Leu Lys Leu
 290 295 300
 Leu Phe Glu Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Ile Asp Asp Lys Ile Ser Phe
 305 310 315 320
 Asp Leu Ser Leu Ala Arg Gly Leu Asp Tyr Tyr Thr Gly Val Ile Tyr
 325 330 335
 Glu Ala Val Leu Leu Gln Thr Pro Ala Gln Ala Gly Glu Glu Pro Leu
 340 345 350
 Gly Val Gly Ser Val Ala Ala Gly Gly Arg Tyr Asp Gly Leu Val Gly
 355 360 365
 Met Phe Asp Pro Lys Gly Arg Lys Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile
 370 375 380
 Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu
 385 390 395 400
 Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala
 405 410 415
 Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp
 420 425 430
 Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu
 435 440 445
 Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
 450 455 460
 Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
 465 470 475 480
 Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu

ES 2 708 565 T3

485

490

495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
500 505

<210> 190

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido HRS mutado con cisteína

10 <400> 190

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1          5          10          15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35          40          45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65          70          75          80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85          90          95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100         105         110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115         120         125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130         135         140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
145         150         155         160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
165         170         175

Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
180         185         190

```

ES 2 708 565 T3

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

435 440 445

Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala
450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu
500 505

<210> 191

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido HRS mutado con cisteína

10 <400> 191

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65 70 75 80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
85 90 95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
130 135 140

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

385		390		395		400
Glu Glu Lys Ile Arg Thr Thr Glu Thr Gln Val Leu Val Ala Ser Ala						
		405		410		415
Gln Lys Lys Leu Leu Glu Glu Arg Leu Lys Leu Val Ser Glu Leu Trp						
		420		425		430
Asp Ala Gly Ile Lys Ala Glu Leu Leu Tyr Lys Lys Asn Pro Lys Leu						
		435		440		445
Leu Asn Gln Leu Gln Tyr Cys Glu Glu Ala Gly Ile Pro Leu Val Ala						
		450		455		460
Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser						
		465		470		475
Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu						
		485		490		495
Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu						
		500		505		

<210> 192
 <211> 1518
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polinucleótido que codifica proteína HRS mutada con cisteína

10 <400> 192

atggcggaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt	60
cttaacaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgcaa attactgaaa	120
ctgaaagctc aacttgacc cgatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgcccaa	180
ggaacccgtg attatagtcc acgtcaaatg gccgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt	240
attcgtgtt ttaaactgca cgggtgctgaa gtaatcgata ccccggtatt tgaattgaaa	300
gagactctga tgggcaaata tgggtgaagat tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa	360
ggaggtgaac tgctgagcct gcgctacgac ttaactgtgc cttttgccg ttacttagcc	420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac	480
cctgcaatga ctcgtggacg ctatcgcgaa ttctatcagg ctgattttga tattgccgga	540
aatttcgacc cgatgatccc ggatgccgag tgtttgaaaa ttatgtgtga aattctgagt	600
tcgttgcaga tcggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatggtagt	660
tttgctatatt gcggtgtttc tgattccaaa ttccgtacaa totgctcaag cgtggacaaa	720

ES 2 708 565 T3

ttggataaag tgtcttgga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct	780
ccagaagtag cagaccgtat tggtagctat gttcaacaac atggcgggtg gtccttagtc	840
gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaaataaac aagcacttga aggactggga	900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttggga ttgatgataa aattagcttt	960
gatctgagct tggcccgcgg tcttgattat tataccggcg tgatttacga agctgttctc	1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag cctttgggag tcggcagtggt ggcagccggg	1080
ggcgttatg atggtttggt aggaatgttt gaccctaag gccgtaaagt accatgtgtg	1140
gggctttcta tcggtgtga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg	1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaacccaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaactg	1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg	1320
ctgtataaaa agaaccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggac	1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa taaaagatg gcgtgattaa actgcgttca	1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc	1500
cgcacgggtc aaccgtta	1518

<210> 193

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica proteína HRS mutada con cisteína

10 <400> 193

atggcggaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt	60
cttaacaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgcaa attactgaaa	120
ctgaaagctc aacttgacc cgatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgccaaa	180
ggaaccctg attatagtc acgtcaaagt gccgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt	240
attcgtgtt ttaaactgca cgggtgctgaa gtaatcgata ccccgctatt tgaattgaaa	300
gagactctga tgggcaaata tggatgaagat tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa	360
ggaggtgaac tgctgagcct gcgctacgac ttaactgtgc cttttgcccg ttacttagcc	420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac	480
cctgcaatga ctcgtggacg ctatcgcgaa ttctatcagg ttgattttga tattgccgga	540
aatttcgacc cgatgatccc ggatgccgag tggttgaaaa ttatgtgtga aattctgagt	600
tcgttgaga tcggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatggtatg	660
tttgctattt ggggtgttct tgattccaaa ttccgtacaa tctgctcaag cgtggacaaa	720

ES 2 708 565 T3

ttggataaag tgtcttggga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct	780
ccagaagtag cagaccgtat tggtgactat gttcaacaac atggcgggtg gtccttagtc	840
gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaaataaac aagcacttga aggactggga	900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttggga ttgatgataa aattagcttt	960
gatctgagct tggcccgcgg tcttgattat tataccggcg tgatttacga agctgttctc	1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag cctttgggag tcggcagtggt ggcagccggg	1080
ggctggttatg atggttttgt aggaatgttt gaccctaag gccgtaaagt accatgtgtg	1140
gggctttcta tcggtgtoga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg	1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaacccaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaactg	1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg	1320
ctgtataaaa agaaccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggac	1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa taaaagatg gcgtgattaa actgcgttca	1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc	1500
cgcacccggc aaccgtta	1518

<210> 194

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica proteína HRS mutada con cisteína

10 <400> 194

atggcggaac gtgccgcaact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtgggt	60
cttaacaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgcaa attactgaaa	120
ctgaaagctc aacttgacc cgtatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgccc aaa	180
ggaacccgtg attatagtc acgtcaaagt gccgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt	240
attcgtgtt ttaaactgca cgggtgctgaa gtaatcgata ccccgctatt tgaattgaaa	300
gagactctga tgggcaaata tgggtgaagat tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa	360
ggaggtgaac tgctgagcct gcgctacgac ttaactgtgc cttttgccc ttacttagcc	420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac	480
cctgcaatga ctcgtggacg ctatcgcgaa ttctatcagt gtgattttga tattgcgga	540
aatttcgacc cgatgatccc ggatgccgag gctttgaaaa ttatgtgtga aattctgagt	600
tcgttgaga tcggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatggatg	660
tttgctatct gcggtgttct tgattccaaa ttccgtacaa tctgctcaag cgtggacaaa	720
ttggataaag tgtcttggga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct	780

ES 2 708 565 T3

```

ccagaagtag cagaccgtat tgggtgactat gttcaacaac atggcggtgt gtccttagtc      840
gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaaataaac aagcacttga aggactggga      900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttggga ttgatgataa aattagcttt      960
gatctgagct tggcccgcg tcttgattat tataccggcg tgatttacga agctgttctc     1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag cctttgggag tcggcagtgt ggcagccggt     1080
ggtcgttatg atggttttgt aggaatgttt gaccctaaag gccgtaaagt accatgtgtg     1140
gggctttcta tcggtgtcga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg     1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaacccaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaaactg     1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg     1320
ctgtataaaa agaaccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggac      1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa ttaaaagatg gcgtgattaa actgcgttca     1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc     1500
cgcacccggtc aaccgtta                                     1518

```

<210> 195

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica proteína HRS mutada con cisteína

10 <400> 195

```

atggcggaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt      60
cttaacaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgccaa attactgaaa     120
ctgaaagctc aacttgacc cgatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgccccaa     180
ggaacccgtg attatagtcc acgtcaaagt gccgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt     240
attcgctgtt ttaaactgca cgggtgctgaa gtaatcgata ccccgctatt tgaattgaaa     300
gagactctga tgggcaaata tgggtgaagat tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa     360
ggaggtgaac tgctgagcct gcgctacgac ttaactgtgc cttttgcccg ttacttagcc     420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac     480
cctgcaatga ctcgtggacg ctatcgcgaa ttctatcagt gtgattttga tattgccgga     540
aatttcgacc cgatgatccc ggatgccgag agtttgaaaa ttatgtgtga aattctgagt     600
tcgttgcaga tcggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatggtatg     660
tttgcatttt gcggtgtttc tgattccaaa ttccgtacaa tctgctcaag cgtggacaaa     720
ttggataaag tgtcttggga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct     780

```

ES 2 708 565 T3

```

ccagaagtag cagaccgtat tgggtgactat gttcaacaac atggcggtgt gtccttagtc      840
gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaaataaac aagcacttga aggactggga      900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttggga ttgatgataa aattagcttt      960
gatctgagct tggcccgcg tcttgattat tataccggcg tgatttacga agctgttctc     1020
ttgcaaacc cagcccagcg gggcgaagag cctttgggag tcggcagtgt ggcagccggt     1080
ggtcgttatg atggttttgt aggaatgttt gaccctaaag gccgtaaagt accatgtgtg     1140
gggctttcta tcggtgtcga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg     1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaccocaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaactg     1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg     1320
ctgtataaaa agaaccogaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggac     1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa taaaagatg gcgtgattaa actgcgttca     1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc     1500
cgcacccggtc aaccgtta                                     1518

```

<210> 196

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica proteína HRS mutada con cisteína

10 <400> 196

```

atggcggaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt      60
cttaacaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgccaa attactgaaa     120
ctgaaagctc aacttgacc cgatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgccccaa     180
ggaaccctg attatagtc acgtcaaag gccgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt     240
attcgtgtt ttaaactgca cgggtgctgaa gtaatcgata ccccgctatt tgaattgaaa     300
gagactctga tgggcaaata tgggtgaagat tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa     360
ggaggtgaac tgctgagcct gcgctacgac ttaactgtgc cttttgcccg ttacttagcc     420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac     480
cctgcaatga ctcgtagcgt ctatcgcgaa ttctatcagt gtgattttga tattgcgga     540
aatttcgacc cgatgatccc ggatgccgag gttttgaaaa ttatgtgtga aattctgagt     600
tcgttgcaga tcggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatggtatg     660
tttgctatct gcggtgttct tgattccaaa ttccgtacaa tctgctcaag cgtggacaaa     720
ttggataaag tgtcttgga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct     780
ccagaagtag cagaccgtat tgggtgactat gttcaacaac atggcggtgt gtccttagtc     840

```

ES 2 708 565 T3

```

gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaaataaac aagcacttga aggactggga      900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttggga ttgatgataa aattagcttt      960
gatctgagct tggcccgcgg tcttgattat tataaccggcg tgatttacga agctgttctc    1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag cctttgggag tcggcagtgt ggcagccggt      1080
ggtcgttatg atggtttggg aggaatgttt gaccctaag gccgtaaagt accatgtgtg      1140
gggctttcta tcgggtgcga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg      1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaacccaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaactg      1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg      1320
ctgtataaaa agaacccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggac      1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa taaaagatg gcgtgattaa actgcgttca      1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc      1500
cgcacgggtc aaccgtta                                     1518

```

<210> 197

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica proteína HRS mutada con cisteína

10 <400> 197

```

atggcggaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt      60
cttaacaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgcaa attactgaaa      120
ctgaaagctc aacttgacc cgatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgccc aaa      180
ggaaccgctg attatagtc acgtcaaagt gccgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt      240
attcgtgtt ttaaacgtca cgggtctgaa gtaatcgata ccccgctatt tgaattgaaa      300
gagactctga tgggcaaata tgggtgaagat tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa      360
ggaggtgaac tgctgagcct gcgctacgac ttaactgtgc cttttgcccg ttacttagcc      420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac      480
cctgcaatga ctcgtggacg ctatcgcgaa ttctatcagt gtgattttga tattgcogga      540
aatctcgacc cgatgatccc ggatgccgag tgtttgaaaa ttatgtgtga aattctgagt      600
tcgttgacga tcggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatgggtatg      660
tttgctatct ccggtgtttc tgattccaaa ttccgtacaa tctgctcaag cgtggacaaa      720
ttggataaag tgtcttgga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct      780
ccagaagtag cagaccgtat tgggtgactat gttcaacaac atggcggtgt gtccttagtc      840

```

ES 2 708 565 T3

```

gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaaataaac aagcacttga aggactggga      900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttggga ttgatgataa aattagcttt      960
gatctgagct tggcccgcgg tcttgattat tataaccggcg tgatttacga agctgttctc    1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag cctttgggag tcggcagtgt ggcagccggt      1080
ggtcggttat atggttttgt aggaatgttt gaccctaaag gccgtaaagt accatgtgtg      1140
gggctttcta tcggtgtcga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg      1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaacccaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaaactg      1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg      1320
ctgtataaaa agaacccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggac      1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa taaaagatg gcgtgattaa actgcgttca      1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc      1500
cgcacgggtc aaccgtta                                     1518

```

<210> 198

<211> 1518

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica proteína HRS mutada con cisteína

10 <400> 198

```

atggcggaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt      60
cttaacaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgcaa attactgaaa      120
ctgaaagctc aacttgacc cgatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgccc aaa      180
ggaaccctg attatagtc acgtcaaagt gccgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt      240
attcgtgtt ttaaacgtca cgggtctgaa gtaatcgata ccccgctatt tgaattgaaa      300
gagactctga tgggcaaata tggatgaagat tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa      360
ggaggtgaac tgctgagcct gcgctacgac ttaactgtgc cttttgccg ttacttagcc      420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac      480
cctgcaatga ctogtgagc ctatcgcgaa ttctatcagt gtgattttga tattgcogga      540
aatctcgacc cgatgatccc ggatgccgag tgtttgaaaa ttatgtgtga aattctgagt      600
tcgttgacga tcggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatgggtatg      660
tttgcatttt gcggtgtttc tgattccaaa ttccgtacaa tctcctcaag cgtggacaaa      720
ttggataaag tgtcttgga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct      780
ccagaagtag cagaccgtat tgggtactat gttcaacaac atggcggtgt gtccttagtc      840
gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaaataaac aagcacttga aggactggga      900

```

gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttggga ttgatgataa aattagcttt 960
gatctgagct tggcccgcgg tcttgattat tataccggcg tgatttacga agctgttctc 1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag cctttgggag tcggcagtgt ggcagccggg 1080
ggtcgttatg atggttttgt aggaatgttt gaccctaaag gccgtaaagt accatgtgtg 1140
gggctttcta tcggtgtcga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg 1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaacccaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaaactg 1260
ttagaagaac gcctgaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg 1320
ctgtataaaa agaaccgcga attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggatc 1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa ttaaagatg gcgtgattaa actgcgttca 1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc 1500
cgcacccggc aaccgtta 1518

<210> 199

<211> 10

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso de Kozak

10 <400> 199

rccrccatgg 10

<210> 200

15 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico de ejemplo

20

<400> 200

Gly Ser Gly Ser

1

25 <210> 201

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Secuencia de enlazador peptídico de ejemplo

<400> 201

Gly Gly Ser Gly

1

35

<210> 202

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico de ejemplo

<400> 202

5 Gly Gly Gly Ser
1

<210> 203

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico de ejemplo

<400> 203

15 Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 204

<211> 4

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico de ejemplo

25 <400> 204

Gly Asn Gly Asn
1

<210> 205

30 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico de ejemplo

35

<400> 205

Gly Gly Asn Gly
1

40 <210> 206

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Secuencia de enlazador peptídico de ejemplo

<400> 206

Gly Gly Gly Asn
1

50

<210> 207

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico de ejemplo

<400> 207

Gly Gly Gly Gly Asn
1 5

5

<210> 208

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico de ejemplo

<400> 208

15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 209

<211> 22

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico de ejemplo

<400> 209

25

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20

<210> 210

<211> 30

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico de ejemplo

35 <400> 210

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 211

40 <211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico de ejemplo

45

<400> 211

Asp Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Asp Ala Ala Ala Arg Glu
1 5 10 15

Ala Ala Ala Arg Asp Ala Ala Ala Lys
20 25

<210> 212

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico de ejemplo

10 <400> 212

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
1 5 10

<210> 213

15 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico

20

<400> 213

Asp Gly Gly Gly Ser
1 5

25 <210> 214

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Secuencia de enlazador peptídico

<400> 214

Thr Gly Glu Lys Pro
1 5

35

<210> 215

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico

<400> 215

Gly Gly Arg Arg
1

45

<210> 216

<211> 14

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico

<400> 216

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp
1 5 10

5

<210> 217

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico

<400> 217

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
1 5 10 15

15

Leu Asp

<210> 218

<211> 8

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico

<400> 218

25

Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser

1

5

30 <210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de enlazador peptídico

<400> 219

Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro
1 5

40

<210> 220

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Secuencia de enlazador peptídico

<400> 220

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
1 5 10

50

<210> 221

<211> 16

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de enlazador peptídico

5

<400> 221

Leu	Arg	Gln	Lys	Asp	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Arg	Pro
1				5					10					15	

10 <210> 222

<211> 19

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

15 <223> Péptido de autoescisión 2A o similar a 2A de origen natural

<400> 222

Leu	Leu	Asn	Phe	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Ser	Asn
1				5					10					15	

Pro Gly Pro

20

<210> 223

<211> 19

<212> PRT

<213> Desconocido

25 <220>

<223> Péptido de autoescisión 2A o similar a 2A de origen natural

<400> 223

Thr	Leu	Asn	Phe	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Ser	Asn
1				5					10					15	

Pro Gly Pro

30

<210> 224

<211> 14

<212> PRT

35 <213> Desconocido

<220>

<223> Péptido de autoescisión 2A o similar a 2A de origen natural

<400> 224

40

Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Ser	Asn	Pro	Gly	Pro
1				5					10				

<210> 225

<211> 17

45 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Péptido de autoescisión 2A o similar a 2A de origen natural

50 <400> 225

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

Pro

<210> 226

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Péptido de autoescisión 2A o similar a 2A de origen natural

10 <400> 226

Gln Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

15

<210> 227

<211> 24

<212> PRT

<213> Desconocido

20 <220>

<223> Péptido de autoescisión 2A o similar a 2A de origen natural

<400> 227

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly
1 5 10 15

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20

25

<210> 228

<211> 40

<212> PRT

30 <213> Desconocido

<220>

<223> Péptido de autoescisión 2A o similar a 2A de origen natural

<400> 228

35

Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro
1 5 10 15

Arg Pro Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys
20 25 30

Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr
35 40

<210> 229

<211> 18

<212> PRT

40 <213> Desconocido

<220>

<223> Péptido de autoescisión 2A o similar a 2A de origen natural

<400> 229

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

Gly Pro

5

<210> 230

<211> 40

<212> PRT

<213> Desconocido

10 <220>

<223> Péptido de autoescisión 2A o similar a 2A de origen natural

<400> 230

Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val
1 5 10 15

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly
20 25 30

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
35 40

15

<210> 231

<211> 33

<212> PRT

20 <213> Desconocido

<220>

<223> Péptido de autoescisión 2A o similar a 2A de origen natural

<400> 231

25

Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu
1 5 10 15

Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
20 25 30

Pro

<210> 232

<211> 7

30 <212> PRT

<213> Virus del jaspeado del tabaco

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

35 <223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

40 <220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)
<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>
<221> VARIANTE

5 <222> (7)..(7)
<223> Xaa es Gly o Ser

<400> 232

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Xaa
1 5

<210> 233

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

15 <213> Virus del jaspeado del tabaco

<400> 233

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

20

<210> 234

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Virus del jaspeado del tabaco

25

<400> 234

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
1 5

30 <210> 235

 $\langle 211 \rangle$ 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

35 <223> Enlazador escindible de trombina

<400> 235

Gly Arg Gly Asp
1

40

<210> 236

 $\langle 211 \rangle$ 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

$\langle 223 \rangle$

100 100

[illegible]

<210> 237

 $\langle 211 \rangle$ 5

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Enlazador escindible de trombina

<400> 237

5 Gly Arg Gly Asp Ser
1 5

<210> 238

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador escindible de trombina

<400> 238

15

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys
1 5

<210> 239

<211> 4

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador escindible de elastasa

25 <400> 239

Ala Ala Pro Val
1

<210> 240

30 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador escindible de elastasa

35

<400> 240

Ala Ala Pro Leu
1

40 <210> 241

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Enlazador escindible de elastasa

<400> 241

Ala Ala Pro Phe
1

50

<210> 242

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Enlazador escindible de elastasa

<400> 242

Ala Ala Pro Ala
1

5

<210> 243

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Enlazador escindible de elastasa

<400> 243

Ala Tyr Leu Val
1

15

<210> 244

<211> 6

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador escindible de metaloproteinasas de la matriz

<220>

<221> VARIANTE

25 <222> (3)..(3)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

30 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 244

Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa
1 5

35

<210> 245

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Enlazador escindible de metaloproteinasas de la matriz

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

45 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 245

Leu Gly Pro Xaa
1

50

<210> 246

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Enlazador escindible de metaloproteinasas de la matriz

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

5
 <400> 246

Gly Pro Ile Gly Pro Xaa
 1 5

10 <210> 247
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Enlazador escindible de metaloproteinasas de la matriz
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

20
 <400> 247

Ala Pro Gly Leu Xaa
 1 5

25 <210> 248
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Enlazador escindible de collagenasa
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

35
 <400> 248

Pro Leu Gly Pro Asp Arg Xaa
 1 5

40 <210> 249
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Enlazador escindible de collagenasa
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

50
 <400> 249

Pro Leu Gly Leu Leu Gly Xaa
 1 5

55 <210> 250
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador escindible de collagenasa

5
 <400> 250

Pro Gln Gly Ile Ala Gly Trp
 1 5

10 <210> 251
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Enlazador escindible de collagenasa

<400> 251

Pro Leu Gly Cys His
 1 5

20
 <210> 252
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Enlazador escindible de collagenasa

<400> 252

Pro Leu Gly Leu Tyr Ala
 1 5

30
 <210> 253
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador escindible de collagenasa

<400> 253

40
 Pro Leu Ala Leu Trp Ala Arg
 1 5

<210> 254
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador escindible de collagenasa

50 <400> 254

Pro Leu Ala Tyr Trp Ala Arg
 1 5

<210> 255
 55 <211> 7
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Enlazador escindible de estromelisin

5 <400> 255

Pro Tyr Ala Tyr Tyr Met Arg
1 5

<210> 256
10 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Enlazador escindible de gelatinasa
15
<400> 256

Pro Leu Gly Met Tyr Ser Arg
1 5

20 <210> 257
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> Enlazador escindible de enzima convertidora de angiotensina

<400> 257

Gly Asp Lys Pro
1

30
<210> 258
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> Enlazador escindible de enzima convertidora de angiotensina

<400> 258

Gly Ser Asp Lys Pro
1 5

40
<210> 259
<211> 4
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Enlazador escindible de catepsina B

<400> 259

50
Ala Leu Ala Leu
1

<210> 260
<211> 4
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador escindible de catepsina B

<400> 260

5

Gly Phe Leu Gly
1

<210> 261

<211> 198

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN con optimización de codones para polipéptido HRS con etiqueta 6xHis

15 <400> 261

```

atggcagaac gtgcggcatt ggaagaattg gttaaactgc aaggtgaacg tgttcgtggt      60
ctgaagcagc agaaggctag cgcggagctg atcgaagaag aggtggccaa actgctgaag      120
ctgaaggcgc agctgggccc ggacgagagc aaacaaaagt tcgtcctgaa aacccccgaaa      180
caccaccatc accatcac                                     198
    
```

<210> 262

20 <211> 66

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido HRS con etiqueta 6xHis

25

<400> 262

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1              5              10              15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35              40              45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys His His His His
          50              55              60

His His
65
    
```

30 <210> 263

<211> 201

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de ADN con optimización de codones para polipéptido HRS con etiqueta 6xHis

<400> 263

ES 2 708 565 T3

```

atgtgtgcag aaagagccgc cctggaagag ttagttaagt tgcaaggtga acgtgtccgt      60
ggctctgaagc agcagaaggc tagcgcgagc ctgatcgaag aagaggtggc caaactgctg      120
aagctgaagg cgcagctggg cccggacgag agcaaacaaa agttcgtcct gaaaaccccg      180
aaacaccacc atcaccatca c                                          201

```

<210> 264

<211> 67

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido HRS con etiqueta 6xHis

10 <400> 264

```

Met Cys Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly
1          5          10          15

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

Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro
          35          40          45

Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys His His His
          50          55          60

His His His
          65

```

<210> 265

15 <211> 198

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN con optimización de codones para polipéptido HRS con etiqueta 6xHis

20

<400> 265

```

atggcagaac gtgcggcatt ggaagaattg gttaaactgc aaggtgaacg tgttcgtggt      60
ctgaagcagc agaagtgcag cgcggagctg atcgaagaag aggtggccaa actgctgaag      120
ctgaaggcgc agctgggccc ggacgagagc aaacaaaagt tcgtcctgaa aaccccgaaa      180
caccaccatc accatcac                                          198

```

25 <210> 266

<211> 66

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Polipéptido HRS con etiqueta 6xHis

<400> 266

ES 2 708 565 T3

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Cys Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys His His His His
 50 55 60
 His His
 65

- 5 <210> 267
- <211> 201
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia de ADN con optimización de codones para polipéptido HRS con etiqueta 6xHis
- <400> 267

atggcagaac gtgcggcatt ggaagaattg gttaaactgc aaggtgaacg tgttcgtggt 60
 ctgaagcagc agaaggctag cgcgagagctg atcgaagaag aggtggccaa actgctgaag 120
 ctgaaggcgc agctgggccc ggacgagagc aaacaaaagt tcgtcctgaa aaccccgaaa 180
 tgccaccacc atcaccatca c 201

- 15 <210> 268
- <211> 67
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Polipéptido HRS con etiqueta 6xHis
- <400> 268

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15
 Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu
 20 25 30
 Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
 35 40 45
 Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys Cys His His His
 50 55 60
 His His His
 65

25

<210> 269
 <211> 1563
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de ADN con optimización de codones para proteína HRS de longitud completa con etiqueta 6xHis

<400> 269

```

atggcggaac gtgccgcact ggaagaattg gttaaattac agggagaacg cgtacgtggt      60
cttaaacaaac aaaaagcctc tgcggaattg attgaagaag aagttgcca attactgaaa      120
ctgaaagctc aacttgacc cgatgaaagt aaacaaaaat ttgtgttgaa aacgccccaa      180
ggaaccgctg attatagtcc acgtcaaatg gccgttcgtg aaaaagtgtt cgacgttatt      240
attcgctggt ttaaacgtca cgggtgctgaa gtaatcgata ccccgctatt tgaattgaaa      300
gagactctga tgggcaaata tggatgaagat tctaaactga tttatgattt gaaagaccaa      360
ggaggtgaac tgctgagcct gcgctacgac ttaactgtgc cttttgcccg ttacttagcc      420
atgaataaat taaccaacat caaacgttac catattgcaa aagtatatcg ccgcgacaac      480
cctgcaatga ctcggtggacg ctatcgcgaa ttctatcagt gtgattttga tattgccgga      540
aatttcgacc cgatgatccc ggatgccgag tgtttgaaaa ttatgtgtga aattctgagt      600
tcgttgcaga tcggagactt tcttgtaaaa gttaatgacc gccgtattct ggatggtatg      660
tttgcatttt gcggtgtttc tgattccaaa ttccgtacaa tctgctcaag cgtggacaaa      720
ttggataaag tgtcttgga agaagtaaaa aatgaaatgg tgggagaaaa aggcctggct      780
ccagaagtag cagaccgtat tgggtactat gttcaacaac atggcggtgt gtccttagtc      840
gaacagttat tacaggatcc taaactgagc caaaataaac aagcacttga aggactggga      900
gatctgaaat tactctttga atatctgacc ttatttggga ttgatgataa aattagcttt      960
gatctgagct tggcccgcg tcttgattat tataccggcg tgatttacga agctgttctc     1020
ttgcaaacc cagcccaggc gggcgaagag cctttgggag tcggcagtgt ggcagccggt     1080
ggtcgttatg atggtttggt aggaatgttt gaccctaaag gccgtaaagt accatgtgtg     1140
gggctttcta tcggtgtcga acgtatcttt tctattgttg aacaacgtct tgaagctttg     1200
gaggaaaaga tccgtaccac ggaaacccaa gtcttagttg caagtgccca aaaaaaactg     1260
ttagaagaac gcctgaaaact cgtatcagaa ctttgggacg ccggcatcaa ggccgaactg     1320
ctgtataaaa agaaccgaa attgttaaac caactccagt attgtgaaga agctgggata     1380
ccactcgtag ctattattgg tgagcaagaa ttaaagatg gcgtgattaa actgcgttca     1440
gtaacaagcc gtgaagaggt agatgtacgt cgcgaagact tagtggaaga aattaaacgc     1500
cgcacccggtc aaccgttatg tatttgcgcg gccgcactcg agcaccacca ccaccaccac     1560
tga
    
```

<210> 270

<211> 520

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Proteína HRS de longitud completa con etiqueta 6xHis

<400> 270

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1              5              10              15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
          35              40              45

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

Tyr Ser Pro Arg Gln Met Ala Val Arg Glu Lys Val Phe Asp Val Ile
65              70              75              80

Ile Arg Cys Phe Lys Arg His Gly Ala Glu Val Ile Asp Thr Pro Val
          85              90              95

Phe Glu Leu Lys Glu Thr Leu Met Gly Lys Tyr Gly Glu Asp Ser Lys
          100              105              110

Leu Ile Tyr Asp Leu Lys Asp Gln Gly Gly Glu Leu Leu Ser Leu Arg
          115              120              125

Tyr Asp Leu Thr Val Pro Phe Ala Arg Tyr Leu Ala Met Asn Lys Leu
          130              135              140

Thr Asn Ile Lys Arg Tyr His Ile Ala Lys Val Tyr Arg Arg Asp Asn
          145              150              155              160

Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Phe Tyr Gln Cys Asp Phe
          165              170              175

Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile Pro Asp Ala Glu Cys Leu
          180              185              190

Lys Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu
          195              200              205

```

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

450 455 460

Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys Asp Gly Val Ile Lys Leu Arg Ser
465 470 475 480

Val Thr Ser Arg Glu Glu Val Asp Val Arg Arg Glu Asp Leu Val Glu
485 490 495

Glu Ile Lys Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Cys Ile Cys Ala Ala Ala
500 505 510

Leu Glu His His His His His
515 520

<210> 271

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento peptídico HARS modificado con cisteína

10 <400> 271

Val Phe Asp Val Ile Ile Arg Cys Phe Lys
1 5 10

<210> 272

15 <211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento peptídico HARS modificado con cisteína

20

<400> 272

Val Tyr Arg Arg Asp Asn Pro Ala Met Thr Arg Gly Arg Tyr Arg Glu
1 5 10 15

Phe Tyr Gln Cys Asp Phe Asp Ile Ala Gly Asn Phe Asp Pro Met Ile
20 25 30

Pro Asp Ala Glu Cys Leu Lys
35

25 <210> 273

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Fragmento peptídico HARS modificado con cisteína

<400> 273

Ile Met Cys Glu Ile Leu Ser Ser Leu Gln Ile Gly Asp Phe Leu Val
1 5 10 15

Lys

<210> 274

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento peptídico HARS modificado con cisteína

10 <400> 274

Val Asn Asp Arg Arg Ile Leu Asp Gly Met Phe Ala Ile Cys Gly Val
1 5 10 15

Ser Asp Ser Lys
20

<210> 275

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento peptídico HARS modificado con cisteína

20

<400> 275

Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys
1 5 10

25 <210> 276

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Fragmento peptídico HARS modificado con cisteína

<400> 276

Phe Arg Thr Ile Cys Ser Ser Val Asp Lys Leu Asp Lys
1 5 10

35

<210> 277

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Fragmento peptídico HARS modificado con cisteína

<400> 277

Val Pro Cys Val Gly Leu Ser Ile Gly Val Glu Arg Ile Phe Ser Ile
1 5 10 15

45

Val Glu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Glu Glu Lys
20 25

<210> 278
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Fragmento peptídico HARS modificado con cisteína
 <400> 278

Leu	Leu	Asn	Gln	Leu	Gln	Tyr	Cys	Glu	Glu	Ala	Gly	Ile	Pro	Leu	Val
1				5					10					15	

Ala Ile Ile Gly Glu Gln Glu Leu Lys
 20 25

10 <210> 279
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Fragmento peptídico HARS modificado con cisteína
 <400> 279

Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro	Leu	Cys	Ile	Cys
1				5					10

20 <210> 280
 <211> 41
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína
 <400> 280

30 gtttgacgta atcatccgtt gctcaagcg ccacggtgca g 41

<210> 281
 <211> 41
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína
 <400> 281

ctgcaccgtg gcgcttgaag caacggtatga ttacgtcaaa c 41

<210> 282
 45 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína
 <400> 282

gccgataccg ggaattctac cagtggtgatt ttgacattgc tggg 44

55 <210> 283

<211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína
 <400> 283
 ccagcaatg tcaaaatcac actggtagaa ttcccggtat cggc 44
 10
 <210> 284
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína
 <400> 284
 20 ccatgatccc tgaatgcagag tgcctgaaga tcatgtgcga g 41
 <210> 285
 <211> 41
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína
 <400> 285
 30 ctcgcacatg atcttcaggc actctgcatc agggatcatg g 41
 <210> 286
 <211> 43
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína
 40 <400> 286
 gcagagtgcc tgaagatcat gtgcgagatc ctgagttcac ttc 43
 <210> 287
 45 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína
 50 <400> 287
 gaagtgaact caggatctcg cacatgatct tcaggcactc tgc 43
 55 <210> 288
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína

<400> 288

ctagatggga tgttgctat ctgtggtgt tctgacagca agttc 45

5 <210> 289
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

<400> 289

15 gaacttgctg tcagaaacac cacagatagc aaacatccca tctag 45

<210> 290
<211> 41
<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

<400> 290

25 cagcaagttc cgtaccatct gctcctcagt agacaagctg g 41

<210> 291
<211> 41
<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

35 <400> 291

ccagcttgct tactgaggag cagatggtac ggaacttgct g 41

<210> 292
<211> 37
<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

45 <400> 292

gggcgcaagg tgccatgtgt ggggctcagc attgggg 37

50 <210> 293
<211> 37
<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

<400> 293

ccccaatgct gagccccaca catggcacct tgcgccc 37

60

<210> 294
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína
 <400> 294
 10 ctgaaccagt tacagtactg tgaggaggca ggcattccc 38
 <210> 295
 <211> 38
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína
 <400> 295
 20 gggatgctg cctcctcaca gtactgtaac tgggtcag 38
 <210> 296
 <211> 39
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína
 30 <400> 296
 gagaacaggc cagcccctct gcatctgcta gaaccacgc 39
 <210> 297
 35 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína
 40 <400> 297
 gctgggttct agcagatgca gaggggctgg cctgttctc 39
 45 <210> 298
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína
 <400> 298
 ccagcccctc tgcattctgt agaaccacgc ttcttg 37
 55 <210> 299
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>

<223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

<400> 299

5 caagaaagct gggttctagc agatgcagag gggctgg 37

<210> 300

<211> 35

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

<400> 300

15 gaacaggcca gccctctag aaccagctt tcttg 35

<210> 301

<211> 35

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

25 <400> 301

caagaaagct gggttctaga ggggctggcc tgttc 35

<210> 302

30 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

35 <400> 302

cccggatgcc gaggcttga aaattatgtg 30

40 <210> 303

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

<400> 303

cacataattt tcaaagcctc ggcacccggg 30

50 <210> 304

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

<400> 304

60 gatcccgat gccgagagtt tgaaaattat gtgtg 35

<210> 305
 <211> 35
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

 <400> 305
 10 cacacataat ttcaaactc tcggcatccg ggatc 35

 <210> 306
 <211> 35
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

 20 <400> 306

 gatcccgat gccgaggttt tgaaaattat gtgtg 35

 <210> 307
 25 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina
 30
 <400> 307

 cacacataat ttcaaaaacc tcggcatccg ggatc 35

 35 <210> 308
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

 <400> 308

 cgccaattct atcaggctga tttgatatt gccgg 35
 45
 <210> 309
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

 <400> 309

 55 ccggcaatat caaaatcagc ctgatagaat tcgcg 35

 <210> 310
 <211> 34
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína

<400> 310

5 cgcggaattct atcaggttga tttgatatt gccg 34

<210> 311
 <211> 34
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína

15 <400> 311

cggcaatattc aaaatcaacc tgatagaatt cgcg 34

<210> 312
 20 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína

25 <400> 312

ggtatgtttg ctatttcggg tgtttctgat tcc 33

30 <210> 313
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína

<400> 313

ggaatcagaa acaccggaaa tagcaaaccat acc 33

40 <210> 314
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína

<400> 314

50 ccaaattccg tacaatctcc tcaagcgtgg acaaattgg 39

<210> 315
 <211> 39
 <212> ADN

55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteína

<400> 315

60

ccaattgtc cacgcttgag gagattgtac ggaattgg 39

<210> 316

<211> 30

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

10 <400> 316

cccgatgcc gaggcttga aaattatgtg 30

<210> 317

15 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para mutar selectivamente residuo de cisteina

20

<400> 317

cacataatt tcaaagcctc ggcacccggg 30

25 <210> 318

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Cebador para polipéptido HRS sin etiquetas

<400> 318

cgccgcaccg gtcaaccgtt acaccaccac caccaccact g 41

35

<210> 319

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Cebador para polipéptido HRS sin etiquetas

<400> 319

45 cagtgtggtt ggtggtggtg taacggttga ccggtgcggc g 41

<210> 320

<211> 39

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para polipéptido HRS sin etiquetas

<400> 320

55

cgccgcaccg gtcaaccgtt atgagatccg gctgctaac 39

<210> 321

<211> 39

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para polipéptido HRS sin etiquetas

5 <400> 321

gtagcagcc ggaatcata acggttgacc ggtgcggcg 39

<210> 322
 10 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de consenso WHEP de HRS
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(6)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido o ausente
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (11)..(12)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 30 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(19)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(28)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(30)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido o ausente
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <222> (32)..(33)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (36)..(36)
 50 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <400> 322

ES 2 708 565 T3

Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Gly Xaa Xaa Val Arg Xaa Leu
1 5 10 15

Lys Xaa Xaa Lys Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa
20 25 30

Xaa Leu Leu Xaa Leu Lys
35

<210> 323

<211> 60

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador usado para crear la proteína de fusión Fc de HRS (1-60) fusionada N-terminal

10 <400> 323

taattttgtt taactttaag aaggagatat acatatgtct gacaaaactc acacatgcc 60

<210> 324

15 <211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador usado para crear la proteína de fusión Fc de HRS (1-60) fusionada N-terminal

20

<400> 324

agcctctccc tgtctccggg taaagcagag cgtgcggcgc tgg 43

25 <210> 325

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Cebador usado para crear la proteína de fusión Fc de HRS (1-60) fusionada N-terminal

<400> 325

ccagcgccgc acgctctgct ttaccggag acagggagag gct 43

35

<210> 326

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Cebador usado para crear la proteína de fusión Fc de HRS (1-60) fusionada N-terminal

<400> 326

45 tttgtttaa cttaagaag gagatataca tatgtctgac aaaactcaca catgcc 57

<210> 327

<211> 37

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador usado para crear la proteína de fusión Fc de HRS (1-60) fusionada N-terminal

<400> 327

ctctccctgt ctccgggtaa agcagagcgt gcggcgc 37

5 <210> 328
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador usado para crear la proteína de fusión Fc de HRS (1-60) fusionada N-terminal

<400> 328

15 gcgccgcacg ctctgctta cccggagaca gggagag 37

<210> 329
<211> 58
<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador usado para crear la proteína de fusión Fc de HRS (1-60) fusionada C-terminal

<400> 329

25 caaacagaaa ttgtgctca aaacccccaa gtctgacaaa actcacacat gccaccg 58

<210> 330
<211> 49
<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador usado para crear la proteína de fusión Fc de HRS (1-60) fusionada C-terminal

35 <400> 330

agcctctccc tgtctccggg taaatgagat ccggctgcta acaaagccc 49

<210> 331
<211> 49
<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador usado para crear la proteína de fusión Fc de HRS (1-60) fusionada C-terminal

45 <400> 331

gggctttgtt agcagccgga tctcattac ccggagacag ggagaggct 49

50 <210> 332
<211> 50
<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador usado para crear la proteína de fusión Fc de HRS (1-60) fusionada C-terminal

<400> 332

60 cagaaatttg tgctcaaac cccaagtct gacaaaactc acacatgccc 50

<210> 333
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador usado para crear la proteína de fusión Fc de HRS (1-60) fusionada C-terminal
 <400> 333
 10 ctctccctgt ctccgggtaa atgagatccg gctgctaaca aag 43
 <210> 334
 <211> 43
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador usado para crear la proteína de fusión Fc de HRS (1-60) fusionada C-terminal
 <400> 334
 20 ctttgttagc agccggatct catttaccg gagacaggga gag 43
 <210> 335
 <211> 867
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de ADN de FC-HRS(1-60) (fusión Fc N-terminal)
 30 <400> 335
 atgtctgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 60
 tcagtcttcc tcttccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 120
 gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 180
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 240
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 300
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc togagaaaac catctccaaa 360
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 420
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 480
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 540
 gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 600
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg cagcaggctc tgcacaacca ctacacgcag 660
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagca gagcgtgcgg cgctggagga gctggtgaaa 720
 cttcagggag agcgcgtgcg aggcctcaag cagcagaagg ccagcgccga gctgatcgag 780
 gaggaggtgg cgaaactcct gaaactgaag gcacagctgg gtcctgatga aagcaaacag 840
 aaatttgtgc tcaaaacccc caagtga 867
 <210> 336

<211> 866
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

5 <223> Secuencia de ADN de HRS(1-60)-Fc (fusión Fc C-terminal)

<400> 336

```

atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgagggc      60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa      120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaagca aacagaaatt tgtgctcaa accccaagt      180
ctgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag      240
tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca      300
catgctgggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg      360
acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt      420
accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca      480
agtgaagggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca      540
aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgagg gagatgacca      600
agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tccagcgac atcgccgtgg      660
agtgggagag caatgggcag cgggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact      720
ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg      780
ggaacgtctt ctcattctcc gtgatgcacg aggtctctga caaccactac acgcagaaga      840
gcctctccct gtctccgggt aaatga      866
    
```

10

<210> 337
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia de proteínas de Fc-HRS(1-60) (fusión Fc N-terminal)

<400> 337

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

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

<210> 338

<211> 288

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas de HRS(1-60)-Fc (fusión Fc C-terminal)

10 <400> 338

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

260

265

270

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280 285

<210> 339

<211> 229

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 339

Met Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
100 105 110

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

10

ES 2 708 565 T3

```

195                200                205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210                215                220

Leu Ser Pro Gly Lys
225

<210> 340
<211> 228
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 340

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1                5                10                15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20                25                30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35                40                45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50                55                60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                70                75                80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85                90                95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100               105               110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115               120               125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
130               135               140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145               150               155               160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165               170               175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

```

ES 2 708 565 T3

180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys
225

<210> 341
<211> 11
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> región bisagra de IgG1 humana modificada

10 <400> 341

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 342
15 <211> 229
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 342

20

Met Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
100 105 110

ES 2 708 565 T3

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Pro Gly Lys
225

<210> 343

<211> 34

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para amplificar Fc-HRS (2-60)

10 <400> 343

gatatacata tgtctgacaa aactcacaca tgcc 34

<210> 344

15 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para amplificar Fc-HRS (2-60)

20

<400> 344

gatcctcgag tcactgggg gttttg 26

25 <210> 345

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> cebador para amplificar HRS (1-60)-Fc

<400> 345

gatatacata tggcagagcg tgcgg 25

<210> 346
 <211> 26
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para amplificar HRS (1-60)-Fc

 <400> 346
 10 gatcctcgag tcatttcccc ggagac 26

 <210> 347
 <211> 867
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de ADN de Fc-HRS(2-60)

 20 <400> 347

 atgtctgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 60
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 120
 gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 180
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 240
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 300
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca togagaaaac catctccaaa 360
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 420
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 480
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 540
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 600
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg cagcaggctc tgcacaacca ctacacgcag 660
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagca gagcgtgcgg cgctggagga gctggtgaaa 720
 cttcagggag agcgcgtgcg aggcctcaag cagcagaagg ccagcgccga gctgatcgag 780
 gaggaggtgg cgaaactcct gaaactgaag gcacagctgg gtcctgatga aagcaaacag 840
 aaatttgtgc tcaaaacccc caagtga 867

 <210> 348
 25 <211> 867
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de ADN de HRS(1-60)-Fc (fusión Fc C-terminal)
 30 <400> 348

ES 2 708 565 T3

```

atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc      60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa      120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgctcaa aacccccaaag      180
tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      240
gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc      300
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      360
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      420
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac      480
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaaccat ctccaaagcc      540
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc      600
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg      660
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac      720
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag      780
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcac gaggtctctg acaaccacta cagcgagaag      840
agcctctccc tgtctccggg taaatga                                          867

```

<210> 349

<211> 288

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas de Fc-HRS(2-60) (fusión Fc N-terminal)

10 <400> 349

```

Met Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
1          5          10          15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
          20          25          30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
          35          40          45

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
          50          55          60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
65          70          75          80

```

ES 2 708 565 T3

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

<210> 350

<211> 288

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas de HRS(1-60)-Fc (fusión Fc C-terminal)

10 <400> 350

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
260 265 270

Ileu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280 285

<210> 351

<211> 39

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para amplificar polipéptidos Fc-HRS

10 <400> 351

ggtggcgaaa ctctgaaat gactcgagga tccggctgc 39

<210> 352

15 <211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para amplificar polipéptidos Fc-HRS

20

<400> 352

gcagccggat cctcgagtca tttcaggagt ttcgccacc 39

25 <210> 353

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> cebador para amplificar polipéptidos Fc-HRS

<400> 353

ctgaaggcac agctgtgact cgaggatccg gctgc 35

35

<210> 354

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> cebador para amplificar polipéptidos Fc-HRS

<400> 354

45 gcagccggat cctcgagtca cagctgtgcc ttcag 35

<210> 355

<211> 36

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador para amplificar polipéptidos Fc-HRS

<400> 355

55

gggtcctgat gaaagctgac tcgaggatcc ggctgc 36

<210> 356
 <211> 36
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para amplificar polipéptidos Fc-HRS

 <400> 356
 10 gcagccggat cctcgagtca gcttcatca ggaccc 36

 <210> 357
 <211> 37
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para amplificar polipéptidos Fc-HRS

 20 <400> 357

 gcaaacagaa atttgtgtga ctcgaggatc cggctgc 37

 <210> 358
 25 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para amplificar polipéptidos Fc-HRS

 30 <400> 358

 gcagccggat cctcgagtca cacaatttc tgtttgc 37

 35 <210> 359
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> cebador para amplificar polipéptidos Fc-HRS

 <400> 359

 gctcaaaacc cccaaggga cccgtgatta tagttgactc gaggatccgg 50
 45
 <210> 360
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador para amplificar polipéptidos Fc-HRS

 <400> 360

 55 ccggaatcctc gagtcaacta taatcacggg ttccctggg ggtttgagc 50

 <210> 361
 <211> 40
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para amplificar polipéptidos HRS-Fc

<400> 361

5 ggtggcgaaa ctctgaaat ctgacaaaac tcacacatgc 40

<210> 362
 <211> 40
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para amplificar polipéptidos HRS-Fc

15 <400> 362

gcatgtgtga gttttgtcag atttcaggag ttctgccacc 40

<210> 363
 20 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para amplificar polipéptidos HRS-Fc

25 <400> 363

ctgaaactga aggcacagct gtctgacaaa actcacacat gc 42

30 <210> 364
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

35 <223> cebador para amplificar polipéptidos HRS-Fc

<400> 364

gcatgtgtga gttttgtcag acagctgtgc cttcagtttc ag 42

40 <210> 365
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador para amplificar polipéptidos HRS-Fc

<400> 365

50 gctgggtcct gatgaaagct ctgacaaaac tcacacatgc 40

<210> 366
 <211> 40
 <212> ADN

55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para amplificar polipéptidos HRS-Fc

<400> 366

60

gcatgtgtga gttttgtcag agctttcatc aggaccacgc 40

<210> 367
<211> 42
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador para amplificar polipéptidos HRS-Fc

10 <400> 367

gaaagcaaac agaaatttgt gtctgacaaa actcacacat gc 42

<210> 368
15 <211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador para amplificar polipéptidos HRS-Fc

20 <400> 368

gcatgtgtga gttttgtcag acacaaattt ctgtttgctt tc 42

25 <210> 369
<211> 49
<212> ADN
<213> Artificial Sequenc
<220>
30 <223> cebador para amplificar polipéptidos HRS-Fc

<400> 369

gctcaaaacc cccaaggga cccgtgatta tagttctgac aaaactcac 49

35 <210> 370
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador para amplificar polipéptidos HRS-Fc

<400> 370

45 gtgagttttg tcagaactat aatcacgggt tccctgggg gttttgagc 49

<210> 371
<211> 807
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia de ADN de Fc-HRS (2-40) (fusión Fc N-terminal)

<400> 371

55

ES 2 708 565 T3

```

atgtctgaca aaactcacac atgccaccg tgcacagcac ctgaactcct ggggggaccg      60
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gacctctgag      120
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac      180
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc      240
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      300
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tggagaaaac catctccaaa      360
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggaggagatg      420
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc      480
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgctgctg      540
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag      600
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg cagcaggctc tgcacaacca ctacacgcag      660
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagca gagcgtgcgg cgctggagga gctggtgaaa      720
cttcagggag agcgcgtgcg aggcctcaag cagcagaagg ccagcgccga gctgatcgag      780
gaggaggtgg cgaaactcct gaaatga                                           807

```

<210> 372

<211> 822

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de Fc-HRS (2-45) (fusión Fc N-terminal)

10 <400> 372

```

atgtctgaca aaactcacac atgccaccg tgcacagcac ctgaactcct ggggggaccg      60
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gacctctgag      120
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac      180
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc      240
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      300
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tggagaaaac catctccaaa      360
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggaggagatg      420
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc      480
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgctgctg      540
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag      600
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg cagcaggctc tgcacaacca ctacacgcag      660
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagca gagcgtgcgg cgctggagga gctggtgaaa      720
cttcagggag agcgcgtgcg aggcctcaag cagcagaagg ccagcgccga gctgatcgag      780
gaggaggtgg cgaaactcct gaaactgaag gcacagctgt ga                                           822

```

<210> 373

<211> 837

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de Fc-HRS (2-50) (fusión Fc N-terminal)

<400> 373

10

```

atgtctgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg      60
tcagtcttcc ttttccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag      120
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      180
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc      240
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      300
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tggagaaaac catctccaaa      360
gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg      420
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc      480
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg      540
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag      600
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg cagcaggctc tgcacaacca ctacacgcag      660
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagca gagcgtgcgg cgctggagga gctggtgaaa      720
cttcagggag agcgcgtgcg aggcctcaag cagcagaagg ccagcgccga gctgatcgag      780
gaggaggtgg cgaaactcct gaaactgaag gcacagctgg gtcctgatga aagctga      837

```

<210> 374

<211> 852

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de Fc-HRS (2-55) (fusión Fc N-terminal)

20 <400> 374

```

atgtctgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg      60
tcagtcttcc ttttccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag      120
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      180

```

ES 2 708 565 T3

```

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 240
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 300
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tggagaaaac catctccaaa 360
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 420
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 480
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 540
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 600
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg cacgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 660
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagca gagcgtgcgg cgctggagga gctggtgaaa 720
cttcagggag agcgcgtgcg aggcctcaag cagcagaagg ccagcgcgga gctgatcgag 780
gaggaggtgg cgaaactcct gaaactgaag gcacagctgg gtcctgatga aagcaaacag 840
aaatttgtgt ga 852

```

<210> 375

<211> 885

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de Fc-HRS (2-66) (fusión Fc N-terminal)

10 <400> 375

```

atgtctgaca aaactcacac atgccaccg tgcaccagc ctgaactcct ggggggaccg 60
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccttgag 120
gtcacatgag tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 180
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 240
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 300
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tggagaaaac catctccaaa 360
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 420
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 480
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 540
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 600
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg cacgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 660
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagca gagcgtgcgg cgctggagga gctggtgaaa 720
cttcagggag agcgcgtgcg aggcctcaag cagcagaagg ccagcgcgga gctgatcgag 780
gaggaggtgg cgaaactcct gaaactgaag gcacagctgg gtcctgatga aagcaaacag 840
aaatttgtgc tcaaaacccc caagggaacc cgtgattata gttga 885

```

15

<210> 376

<211> 807
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

5 <223> Secuencia de ADN de HRS(1-40)-Fc (fusión Fc C-terminal)

<400> 376

```

atggcagagc gtgcgggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgagggc      60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa      120
tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      180
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc      240
acatgcgttg tggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      300
gacggcgctg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg      360
taccgtgttg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac      420
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaaccat ctccaaagcc      480
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc      540
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg      600
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac      660
tccgaoggct ccttcttcct ctacagcaag ctacccgttg acaagagcag gtggcagcag      720
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcac gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag      780
agcctctccc tgtctccggg taaatga      807
    
```

10

<210> 377
 <211> 822
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia de ADN de HRS(1-45)-Fc (fusión Fc C-terminal)

<400> 377

```

atggcagagc gtgcgggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgagggc      60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa      120
ctgaaggcac agctgtctga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc      180
ctggggggac cgtcagttct cctcttcccc caaaaccca aggacaccct catgatctcc      240
cggacccctg aggtcacatg cgtggtgggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag      300
ttcaactggg acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag      360
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctaccg tctgcacca ggactggctg      420
    
```

20

ES 2 708 565 T3

```

aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa      480
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc      540
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc      600
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg      660
cctcccgctg tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag      720
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcacgaggc tctgcacaac      780
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga                          822

```

<210> 378

<211> 837

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de HRS(1-50)-Fc (fusión Fc C-terminal)

10 <400> 378

```

atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgaggc      60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa      120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc      180
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac      240
accctcatga tctcccgac cctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccaogaa      300
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca      360
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg      420
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctocca      480
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac      540
accctgcccc catcccgga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc      600
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC      660
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag      720
ctcacctggg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgtct cgtgatgcac      780
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga      837

```

<210> 379

15 <211> 852

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de HRS(1-55)-Fc (fusión Fc C-terminal)

20

<400> 379

ES 2 708 565 T3

```

atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgagggc      60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa      120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgtctga caaaactcac      180
acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc      240
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg      300
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg      360
cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc      420
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc      480
aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga      540
gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc      600
ctgacctgcc tgggtcaaag cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat      660
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctg tggactccga cggctccttc      720
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca      780
tgctccgtga tgcacgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct      840
ccgggtaaat ga      852

```

<210> 380

<211> 885

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de HRS(1-66)-Fc (fusión Fc C-terminal)

10 <400> 380

```

atggcagagc gtgcggcgct ggaggagctg gtgaaacttc agggagagcg cgtgcgagggc      60
ctcaagcagc agaaggccag cgccgagctg atcgaggagg aggtggcgaa actcctgaaa      120
ctgaaggcac agctgggtcc tgatgaaagc aaacagaaat ttgtgtctca aacccccaaag      180
ggaacccgtg attatagtcc tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa      240
ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgata      300
tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc      360
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag      420
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg      480
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag      540
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca      600
tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggtctctat      660
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc      720

```

ES 2 708 565 T3

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 780
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcacga ggctctgcac 840
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga 885

<210> 381

<211> 268

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas de Fc-HRS (2-40) (fusión Fc N-terminal)

10 <400> 381

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

ES 2 708 565 T3

180						185						190					
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser		
		195					200					205					
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser		
	210					215					220						
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Val	Lys		
225					230					235					240		
Leu	Gln	Gly	Glu	Arg	Val	Arg	Gly	Leu	Lys	Gln	Gln	Lys	Ala	Ser	Ala		
				245					250					255			
Glu	Leu	Ile	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys						
			260					265									

<210> 382

<211> 273

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia de proteínas de Fc-HRS (2-45) (fusión Fc N-terminal)

10 <400> 382

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

ES 2 708 565 T3

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Pro Gly Lys Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys
225 230 235 240

Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala
245 250 255

Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln
260 265 270

Leu

<210> 383

<211> 278

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas de Fc-HRS (2-50) (fusión Fc N-terminal)

10 <400> 383

Met Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

ES 2 708 565 T3

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
100 105 110

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Pro Gly Lys Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys
225 230 235 240

Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala
245 250 255

Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln
260 265 270

Leu Gly Pro Asp Glu Ser
275

<210> 384

<211> 283

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas de Fc-HRS (2-55) (fusión Fc N-terminal)

<400> 384

```

Met Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 1              5              10              15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
      20              25              30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
      35              40              45

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50              55              60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
65              70              75              80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
      85              90              95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
      100              105              110

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
      115              120              125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
      130              135              140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145              150              155              160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
      165              170              175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
      180              185              190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
      195              200              205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210              215              220

```

ES 2 708 565 T3

Leu Ser Pro Gly Lys Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys
225 230 235 240

Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala
245 250 255

Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln
260 265 270

Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val
275 280

<210> 385

<211> 294

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas de Fc-HRS (2-66) (fusión Fc N-terminal)

10 <400> 385

Met Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
1 5 10 15

Ileu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
100 105 110

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

ES 2 708 565 T3

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Pro Gly Lys Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys
225 230 235 240

Leu Gln Gly Glu Arg Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala
245 250 255

Glu Leu Ile Glu Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln
260 265 270

Leu Gly Pro Asp Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
275 280 285

Gly Thr Arg Asp Tyr Ser
290

<210> 386

<211> 268

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas de HRS(1-40)-Fc (fusión Fc C-terminal)

10 <400> 386

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

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

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

ES 2 708 565 T3

50		55		60											
Pro 65	Pro 66	Lys 67	Pro 68	Lys 69	Asp 70	Thr 71	Leu 72	Met 73	Ile 74	Ser 75	Arg 76	Thr 77	Pro 78	Glu 79	Val 80
Thr 81	Cys 82	Val 83	Val 84	Val 85	Asp 86	Val 87	Ser 88	His 89	Glu 90	Asp 91	Pro 92	Glu 93	Val 94	Lys 95	Phe 96
Asn 97	Trp 98	Tyr 99	Val 100	Asp 101	Gly 102	Val 103	Glu 104	Val 105	His 106	Asn 107	Ala 108	Lys 109	Thr 110	Lys 111	Pro 112
Arg 113	Glu 114	Glu 115	Gln 116	Tyr 117	Asn 118	Ser 119	Thr 120	Tyr 121	Arg 122	Val 123	Val 124	Ser 125	Val 126	Leu 127	Thr 128
Val 129	Leu 130	His 131	Gln 132	Asp 133	Trp 134	Leu 135	Asn 136	Gly 137	Lys 138	Glu 139	Tyr 140	Lys 141	Cys 142	Lys 143	Val 144
Ser 145	Asn 146	Lys 147	Ala 148	Leu 149	Pro 150	Ala 151	Pro 152	Ile 153	Glu 154	Lys 155	Thr 156	Ile 157	Ser 158	Lys 159	Ala 160
Lys 161	Gly 162	Gln 163	Pro 164	Arg 165	Glu 166	Pro 167	Gln 168	Val 169	Tyr 170	Thr 171	Leu 172	Pro 173	Pro 174	Ser 175	Arg 176
Glu 177	Glu 178	Met 179	Thr 180	Lys 181	Asn 182	Gln 183	Val 184	Ser 185	Leu 186	Thr 187	Cys 188	Leu 189	Val 190	Lys 191	Gly 192
Phe 193	Tyr 194	Pro 195	Ser 196	Asp 197	Ile 198	Ala 199	Val 200	Glu 201	Trp 202	Glu 203	Ser 204	Asn 205	Gly 206	Gln 207	Pro 208
Glu 209	Asn 210	Asn 211	Tyr 212	Lys 213	Thr 214	Thr 215	Pro 216	Pro 217	Val 218	Leu 219	Asp 220	Ser 221	Asp 222	Gly 223	Ser 224
Phe 225	Phe 226	Leu 227	Tyr 228	Ser 229	Lys 230	Leu 231	Thr 232	Val 233	Asp 234	Lys 235	Ser 236	Arg 237	Trp 238	Gln 239	Gln 240
Gly 241	Asn 242	Val 243	Phe 244	Ser 245	Cys 246	Ser 247	Val 248	Met 249	His 250	Glu 251	Ala 252	Leu 253	His 254	Asn 255	His 256
Tyr 257	Thr 258	Gln 259	Lys 260	Ser 261	Leu 262	Ser 263	Leu 264	Ser 265	Pro 266	Gly 267	Lys 268				

<210> 387

<211> 273

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas de HRS(1-45)-Fc (fusión Fc C-terminal)

10 <400> 387

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

245

250

255

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
260 265 270

Lys

<210> 388

<211> 278

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas de HRS(1-50)-Fc (fusión Fc C-terminal)

10 <400> 388

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1 5 10 15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
35 40 45

Glu Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
50 55 60

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
65 70 75 80

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
85 90 95

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
100 105 110

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

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
130 135 140

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
145 150 155 160

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
165 170 175

ES 2 708 565 T3

```

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

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
      195                      200                      205

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
      210                      215                      220

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
225                      230                      235                      240

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
      245                      250                      255

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
      260                      265                      270

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      275

```

<210> 389

<211> 283

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas de HRS(1-55)-Fc (fusión Fc C-terminal)

10 <400> 389

```

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
1      5      10      15

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

Glu Glu Val Ala Lys Leu Leu Lys Leu Lys Ala Gln Leu Gly Pro Asp
      35      40      45

Glu Ser Lys Gln Lys Phe Val Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
      50      55      60

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
65      70      75      80

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
      85      90      95

```

ES 2 708 565 T3

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 100 105 110
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 115 120 125
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 130 135 140
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 145 150 155 160
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 165 170 175
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 180 185 190
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 195 200 205
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 210 215 220
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 225 230 235 240
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 245 250 255
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 260 265 270
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 275 280

<210> 390

<211> 294

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas de HRS(1-66)-Fc (fusión Fc C-terminal)

10 <400> 390

Met Ala Glu Arg Ala Ala Leu Glu Glu Leu Val Lys Leu Gln Gly Glu
 1 5 10 15

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290

<210> 391
<211> 24
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador usado para amplificar Fc-HRS (2-60)
10 <400> 391
tattctcgag gcagagcgtg cggc 24
<210> 392
15 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador usado para amplificar Fc-HRS (2-60)
20 <400> 392
gcgcctcgag tcacttgggg gttttg 26
<210> 393
25 <211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
30 <223> cebador usado para amplificar Fc-HRS (2-60)
<400> 393
gtgctcaaaa cccccaaggc agagcgtgcg gcgctgg 37
35 <210> 394
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
40 <220>
<223> cebador usado para amplificar Fc-HRS (2-60)
<400> 394
45 ccagcgccgc acgctctgcc ttgggggttt tgagcac 37
<210> 395
<211> 1044
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia de ADN de Fc-HRS(2-60) HRS(2-60) (fusión Fc N-terminal)
<400> 395
55

ES 2 708 565 T3

```

atgtctgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg      60
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag      120
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      180
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc      240
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      300
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tggagaaaac catctccaaa      360
gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg      420
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc      480
gtggagtggtg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg      540
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag      600
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg cagcaggctc tgcacaacca ctacacgcag      660
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagca gacgctgcgg cgctggagga gctggtgaaa      720
cttcagggag agcgctgctg aggcctcaag cagcagaagg ccagcgccga gctgatcgag      780
gaggaggtgg cgaaactcct gaaactgaag gcacagctgg gtcctgatga aagcaaacag      840
aaatgtgtgc tcaaaacccc caaggcagag cgtgcggcgc tggaggagct ggtgaaactt      900
cagggagagc gcgtgcgagg cctcaagcag cagaaggcca gcgccgagct gatcgaggag      960
gaggtggcga aactcctgaa actgaaggca cagctgggtc ctgatgaaag caaacagaaa     1020
tttgtgctca aaacccccaa gtga                                           1044

```

<210> 396

<211> 347

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas de Fc-HRS(2-60) HRS(2-60) (fusión Fc N-terminal)

10 <400> 396

```

Met Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
1           5           10           15

```

```

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
          20           25           30

```

```

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
          35           40           45

```

```

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

```

ES 2 708 565 T3

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

ES 2 708 565 T3

Val Arg Gly Leu Lys Gln Gln Lys Ala Ser Ala Glu Leu Ile Glu Glu
305 310 315 320

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

Ser Lys Gln Lys Phe Val Leu Lys Thr Pro Lys
340 345

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión histidil-ARNt sintetasa (HRS)-Fc, que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 98 % idéntica a la SEQ ID NO:337, donde el polipéptido de fusión HRS-Fc tiene una actividad antiinflamatoria, y tiene farmacocinética alterada con respecto a un polipéptido de HRS no modificado que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO:6, donde dicha farmacocinética alterada es mayor semivida en suero, mayor biodisponibilidad y/o disminución del aclaramiento.
2. El polipéptido de fusión HRS-Fc de la reivindicación 1, donde la región Fc y el polipéptido de HRS están separados por un enlazador peptídico.
3. El polipéptido de fusión HRS-Fc de la reivindicación 2, donde el enlazador peptídico tiene 1-10 aminoácidos, o 1-5 aminoácidos de longitud.
4. El polipéptido de fusión HRS-Fc de la reivindicación 1, donde el polipéptido de fusión HRS tiene una semivida de al menos 30 horas en ratones.
5. El polipéptido de fusión HRS-Fc de la reivindicación 1, donde la biodisponibilidad es una biodisponibilidad subcutánea que está aumentada en al menos un 30 %.
6. Una composición terapéutica, que comprende el polipéptido de fusión HRS-Fc de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, donde el polipéptido de fusión HRS-Fc es al menos un 95 % puro y menos del 5 % agregado, y donde la composición está sustancialmente libre de endotoxinas.
7. El polipéptido de fusión HRS-Fc de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 6, para uso como un medicamento.
8. El polipéptido de fusión HRS-Fc de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la composición terapéutica de la reivindicación 6, para uso en la reducción de la inflamación tisular en un sujeto que lo necesite.
9. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de fusión HRS-Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
10. Un procedimiento para fabricar un polipéptido de fusión histidil-ARNt sintetasa (HRS)-Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende a) cultivar una célula huésped de *E. coli* K-12 para expresar un polipéptido de fusión HRS-Fc, donde la célula huésped comprende un polinucleótido de la reivindicación 9 que está unido de forma operativa a un elemento regulador; y b) aislar el polipéptido de fusión HRS-Fc a partir de la célula huésped.

Anticuerpo	Ser humano y ratón			
	Cadena ligera	Subtipo	Cadena pesada	
IgA	K λ K λ	IgA1 IgA2	α 1 α 2	Diagram illustrating the structure of an antibody molecule, showing the heavy chain (Cadena pesada) and light chain (Cadena ligera) domains. The heavy chain is composed of μ, γ, α, δ, or ϵ, and the light chain is composed of κ or λ.
IgE	K λ	Ninguno	ϵ	
IgD	K λ	Ninguno	δ	
IgM	K λ	Ninguno	μ	
	Humano			Ratón
	Cadena ligera	Subtipo	Cadena pesada	
IgG	K λ K λ K λ K λ	IgG1 IgG2 IgG3 IgG4	γ 1 γ 2 γ 3 γ 4	K λ K λ K λ K λ IgG1 IgG2a IgG2b IgG3 γ 1 γ 2a γ 2b γ 3

Figura 1

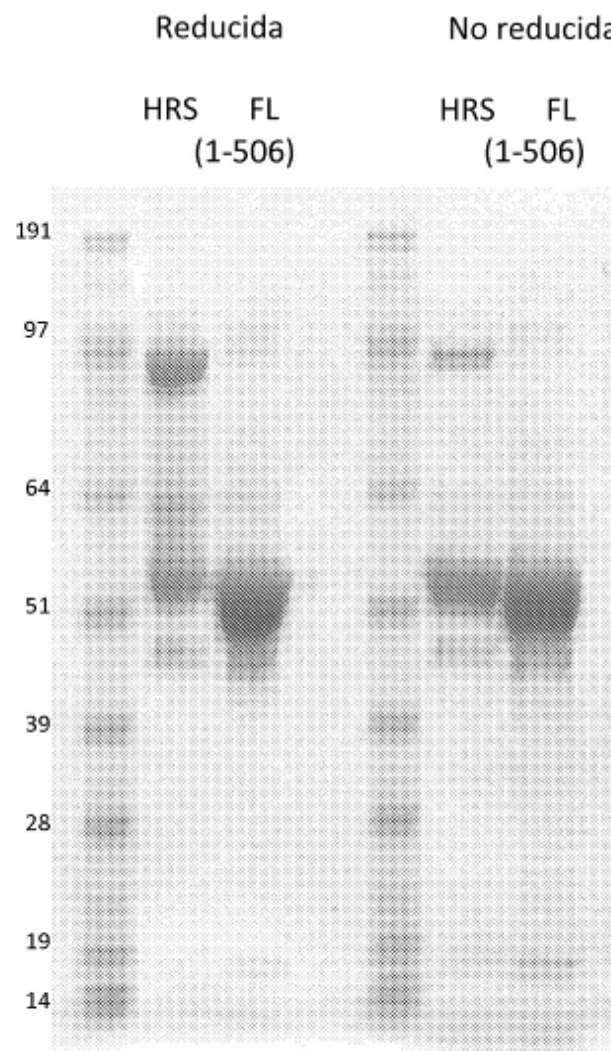


Figura 3

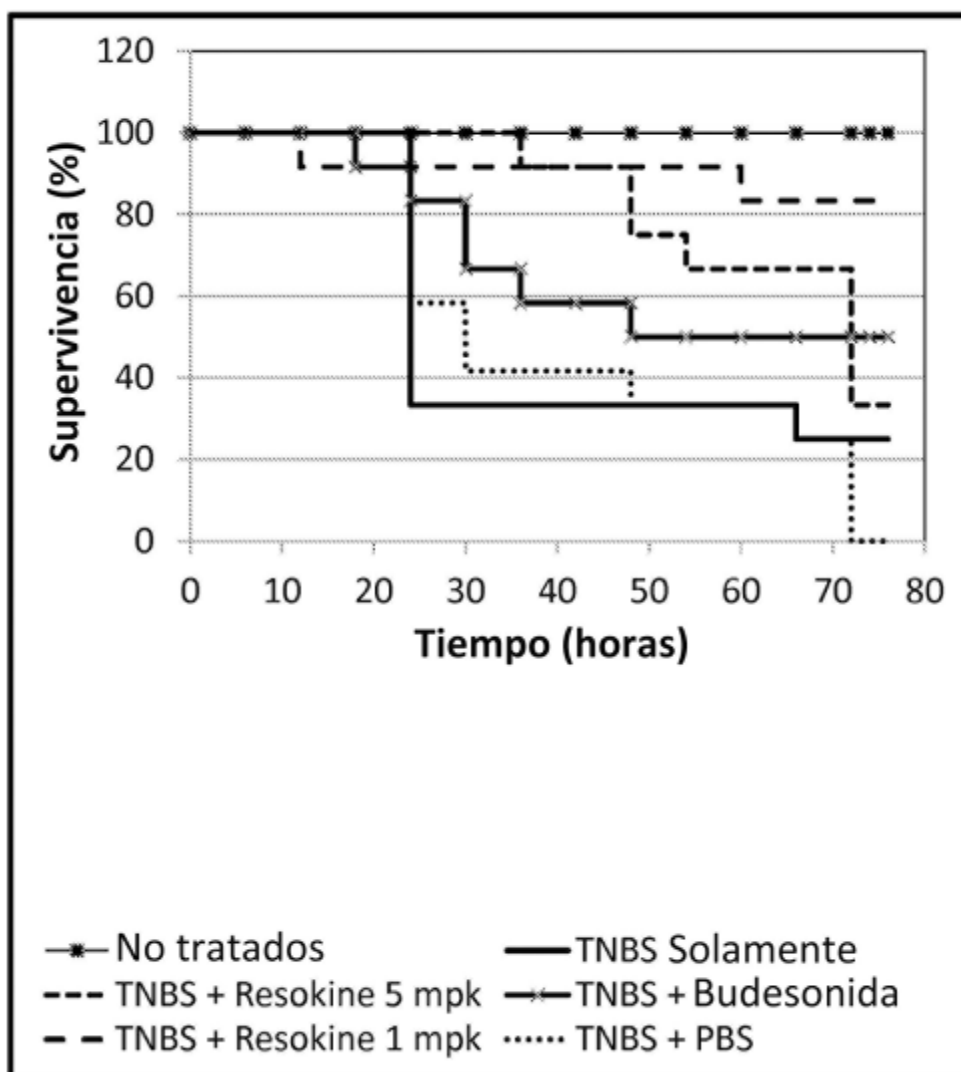


Figura 4

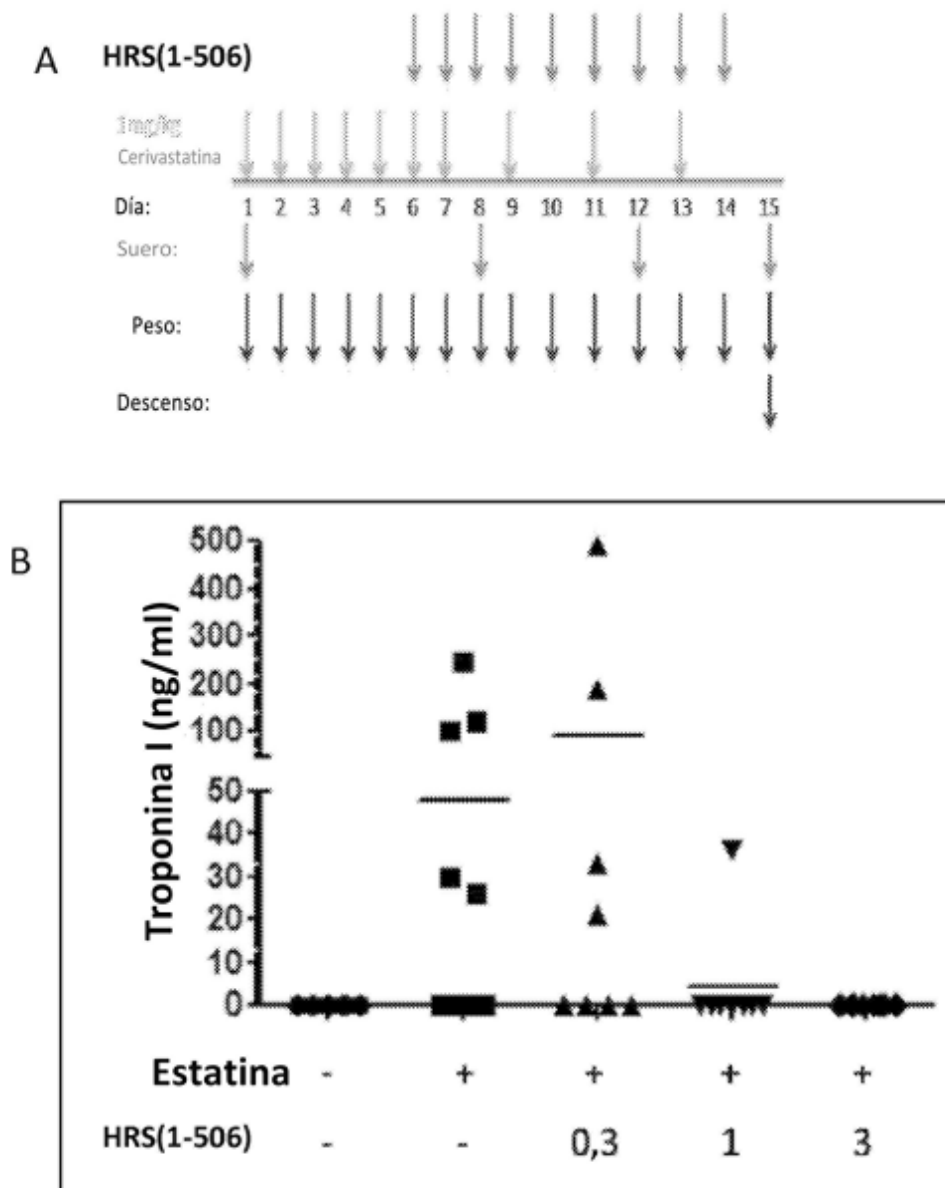


Figura 5

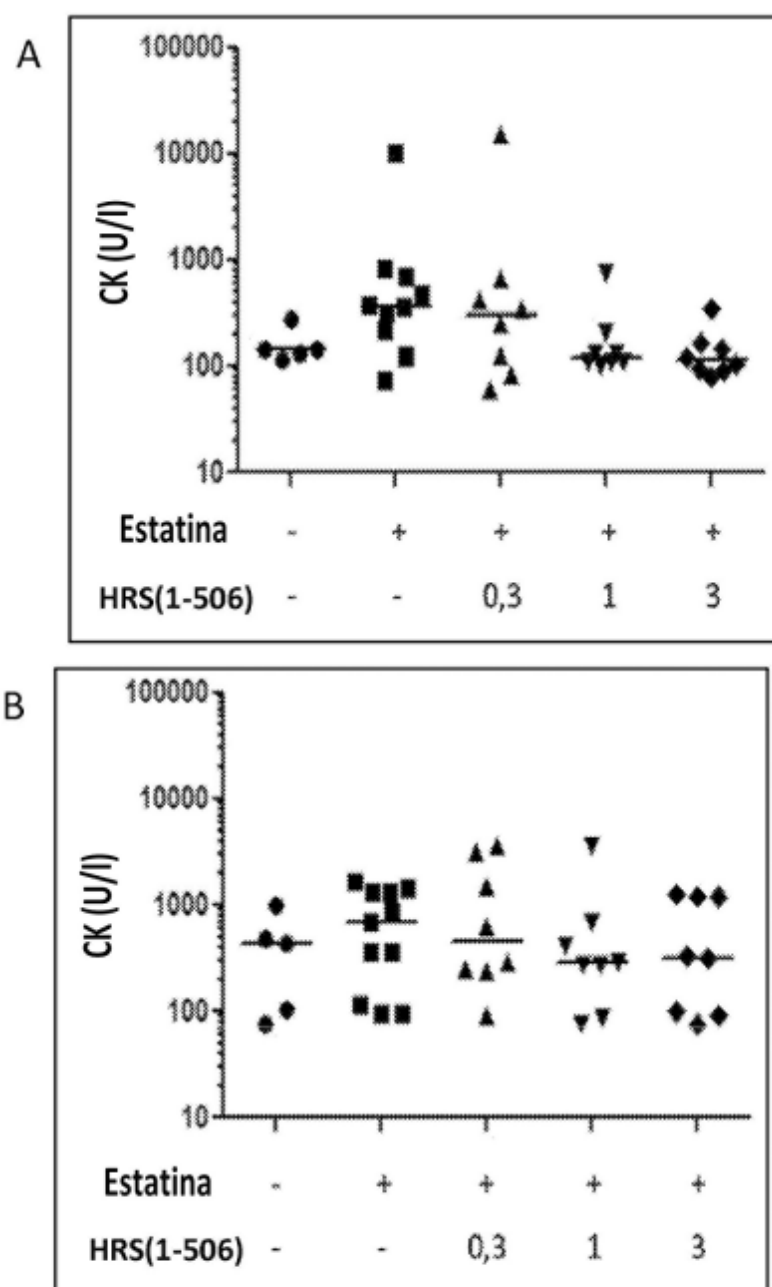


Figura 6

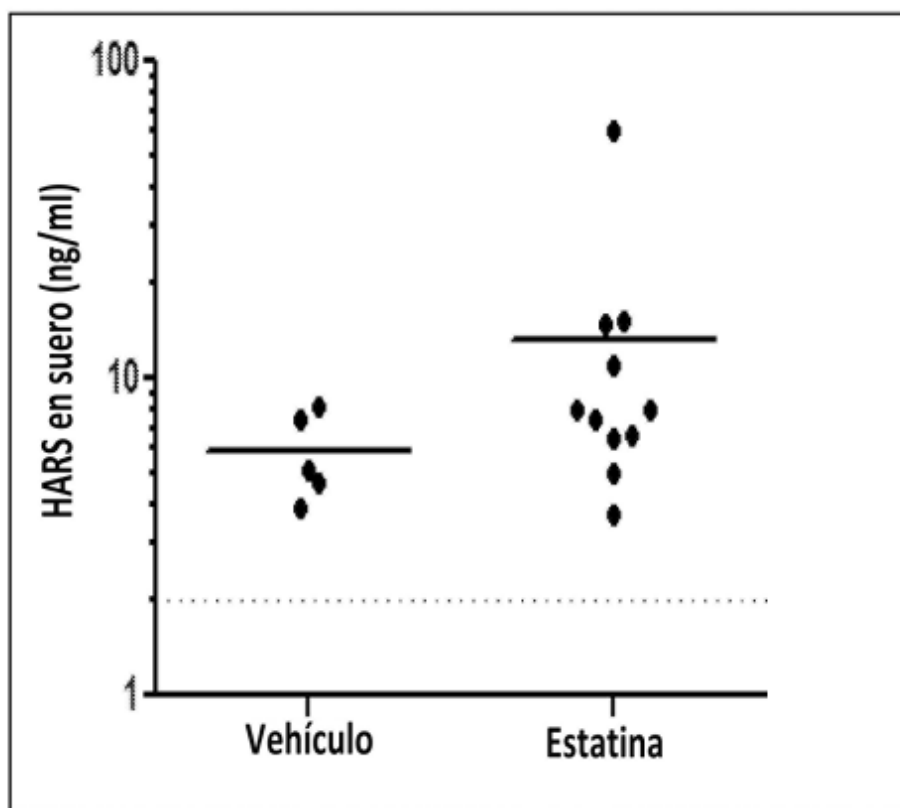


Figura 7

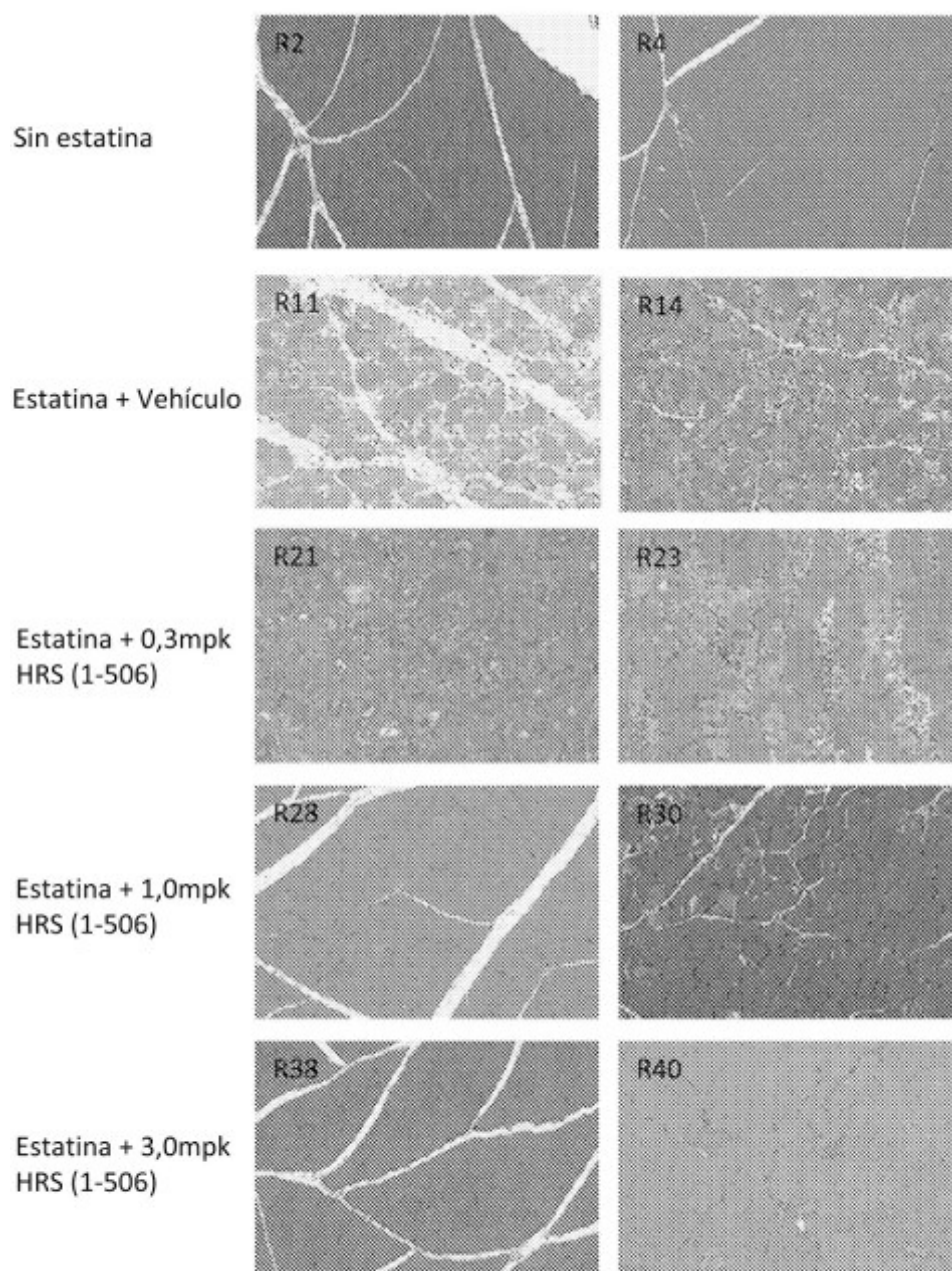


Figura 8

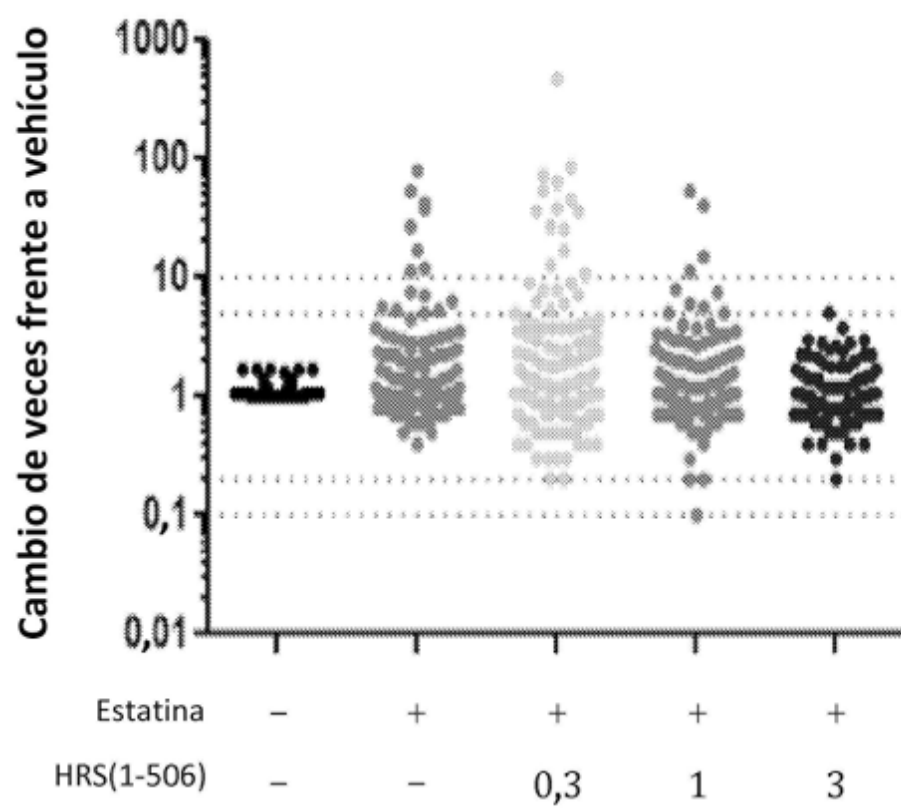


Figura 9

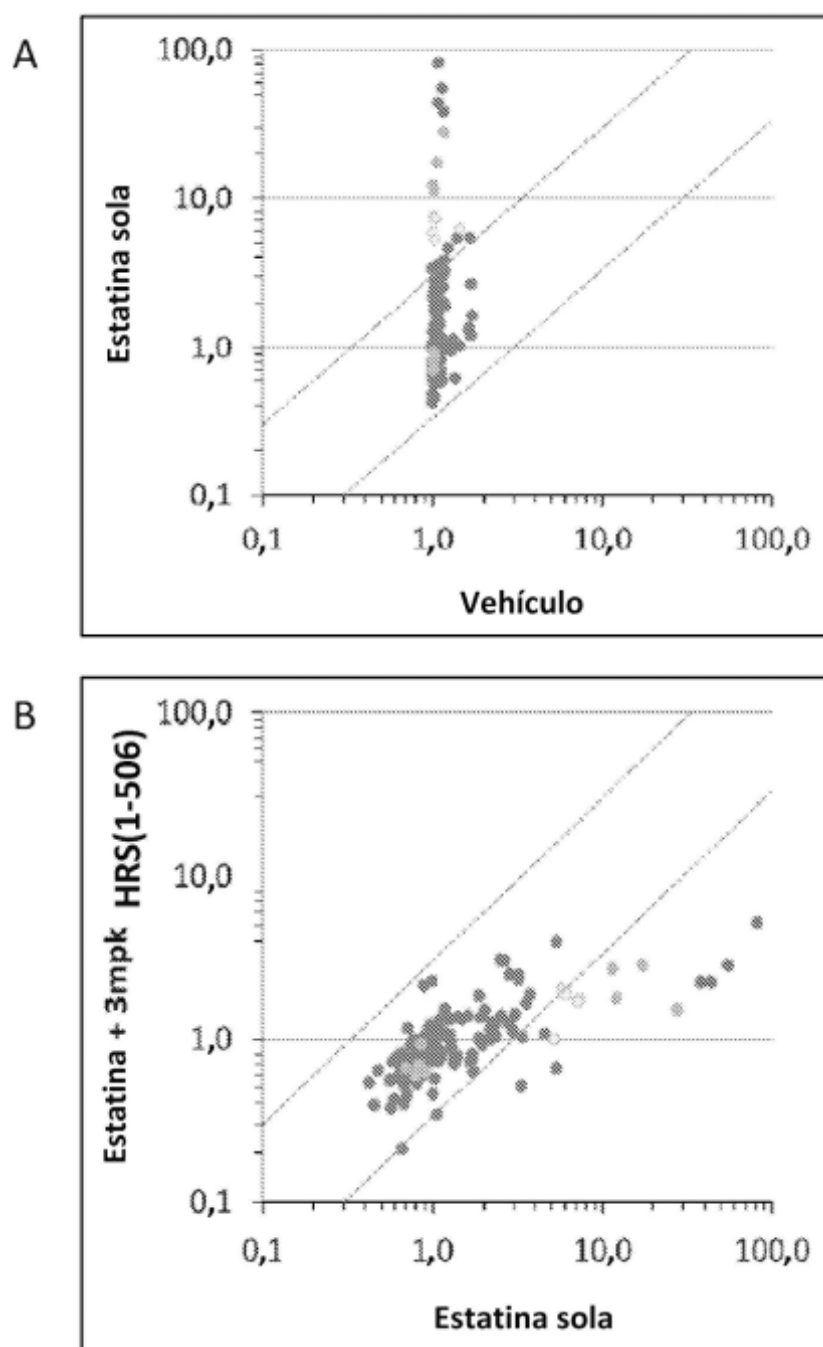


Figura 10

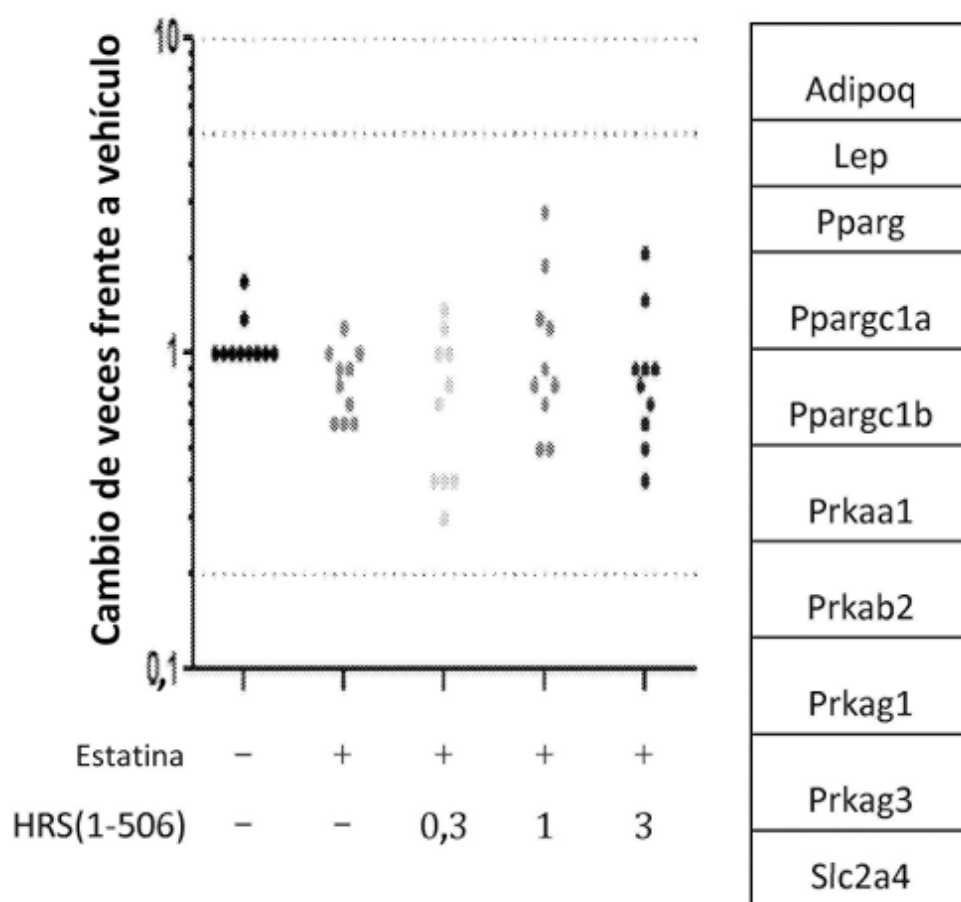


Figura 11

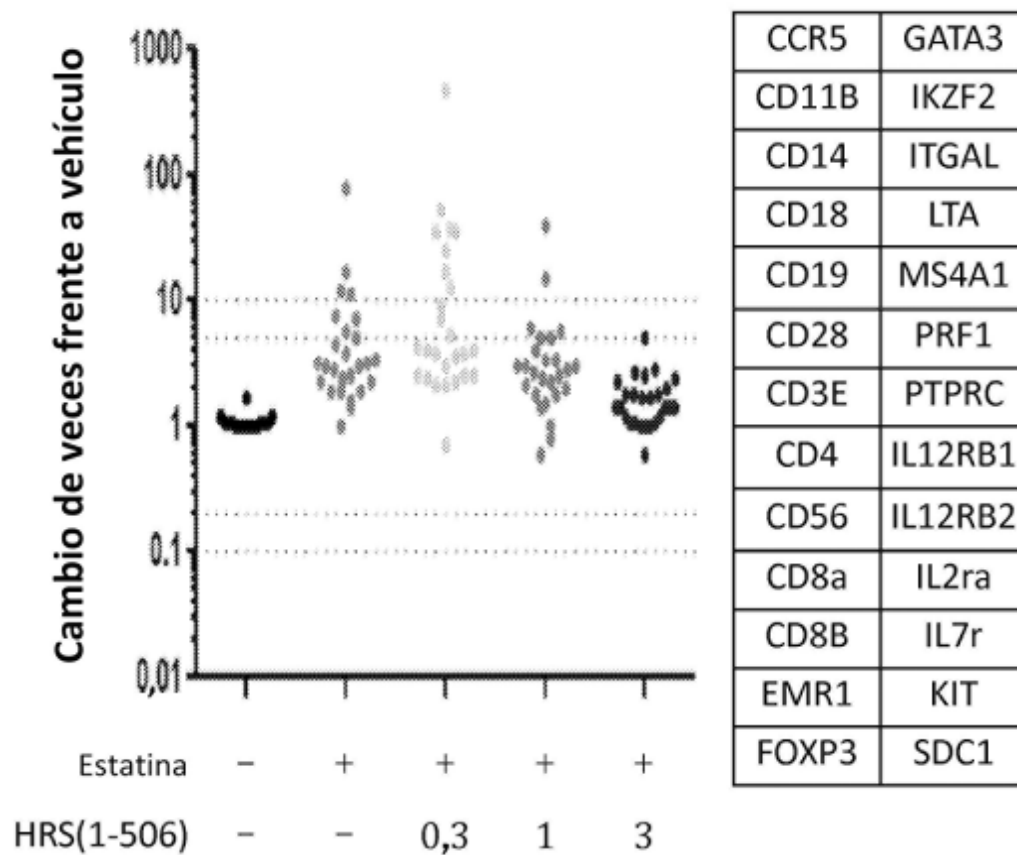


Figura 12

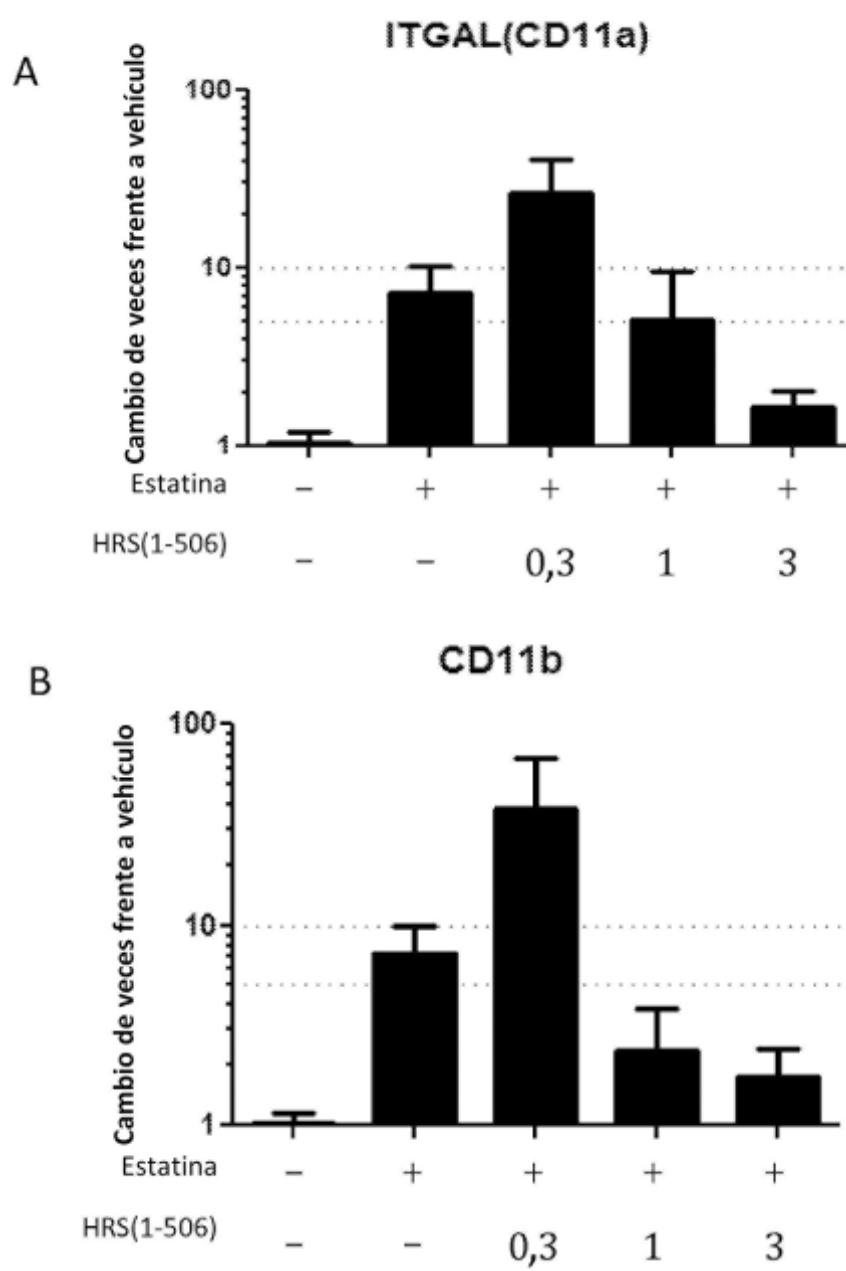


Figura 13

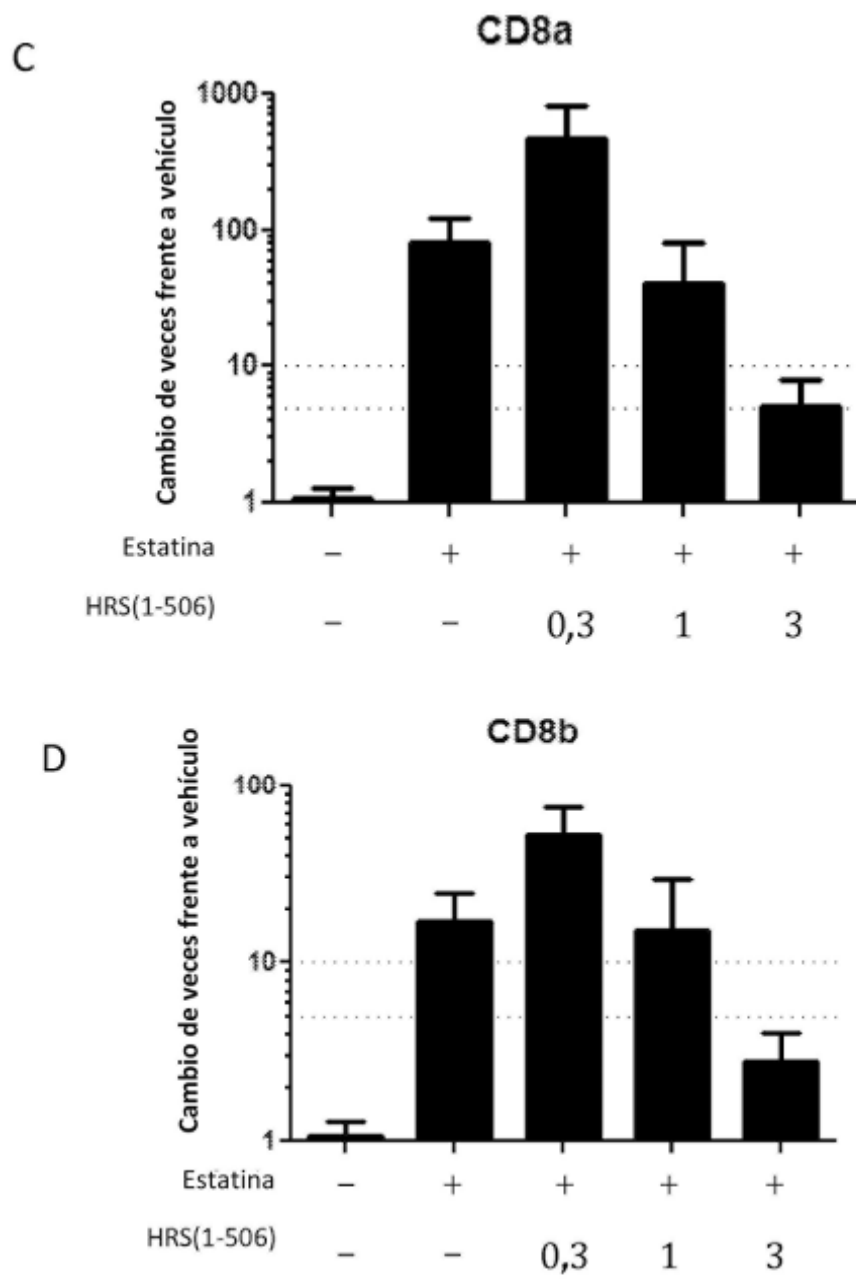


Figura 13

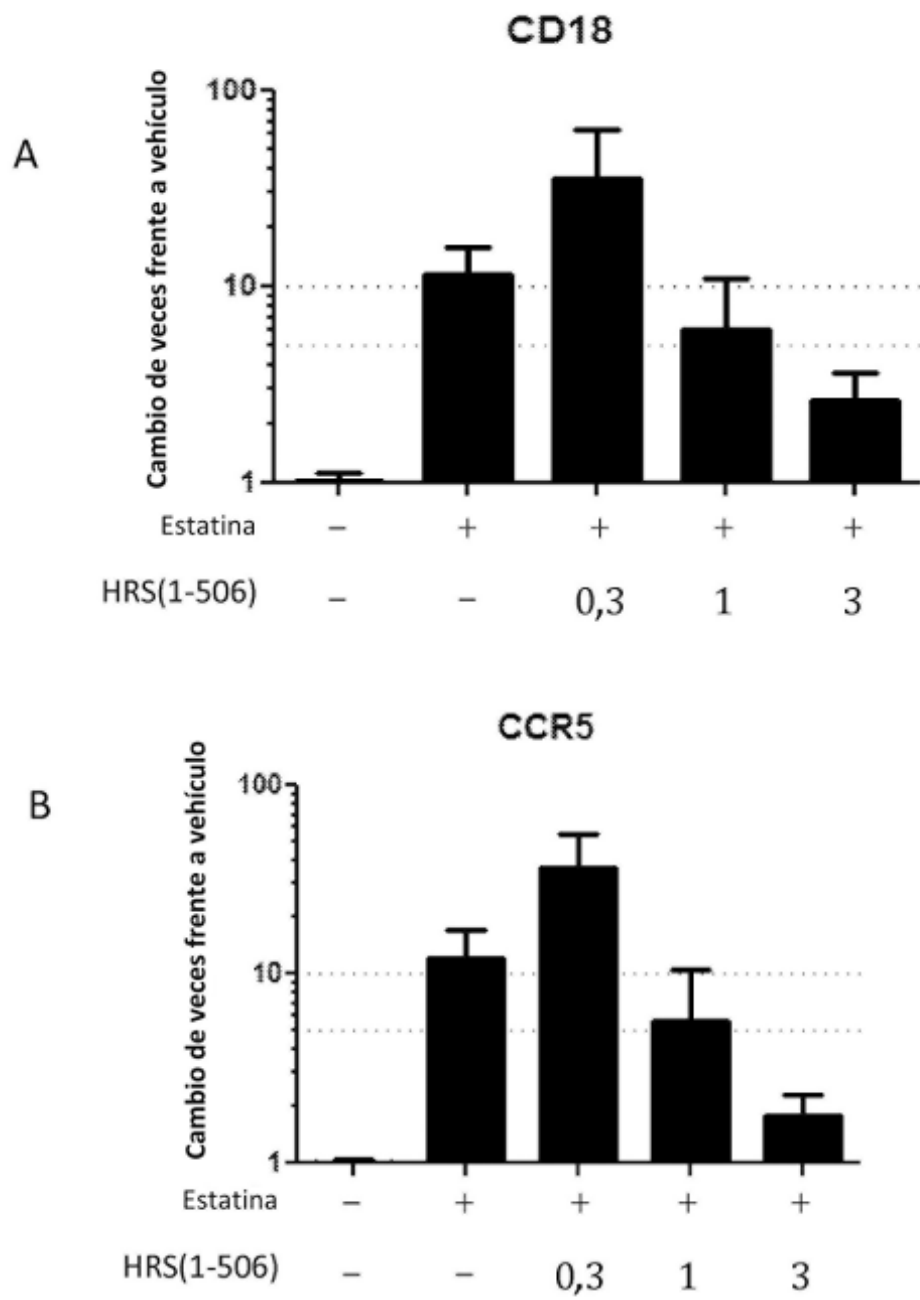


Figura 14

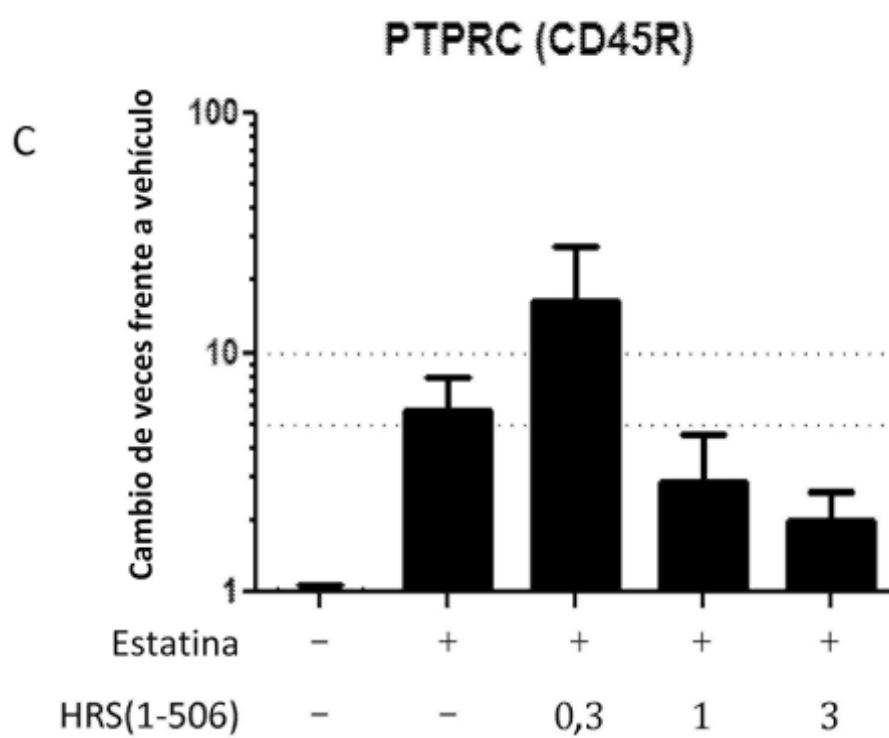


Figura 14

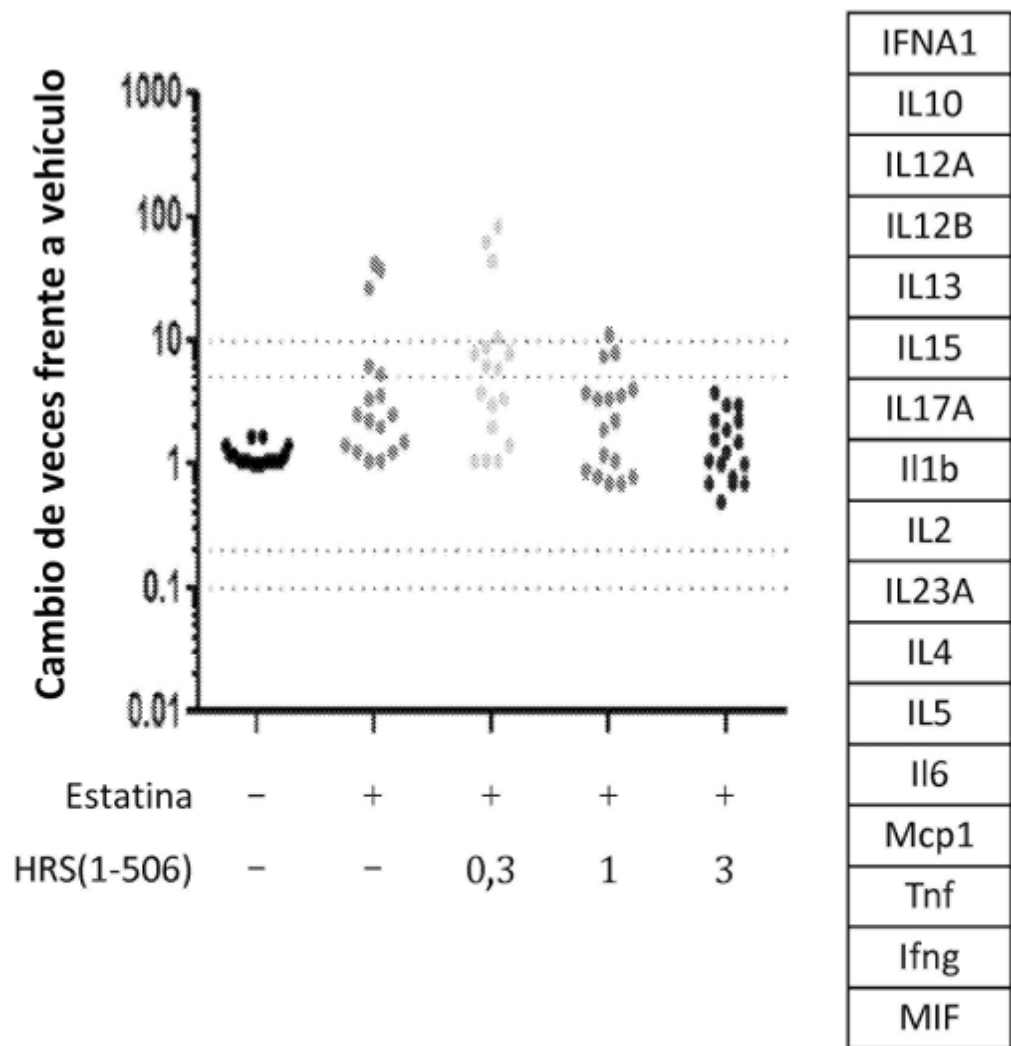


Figura 15

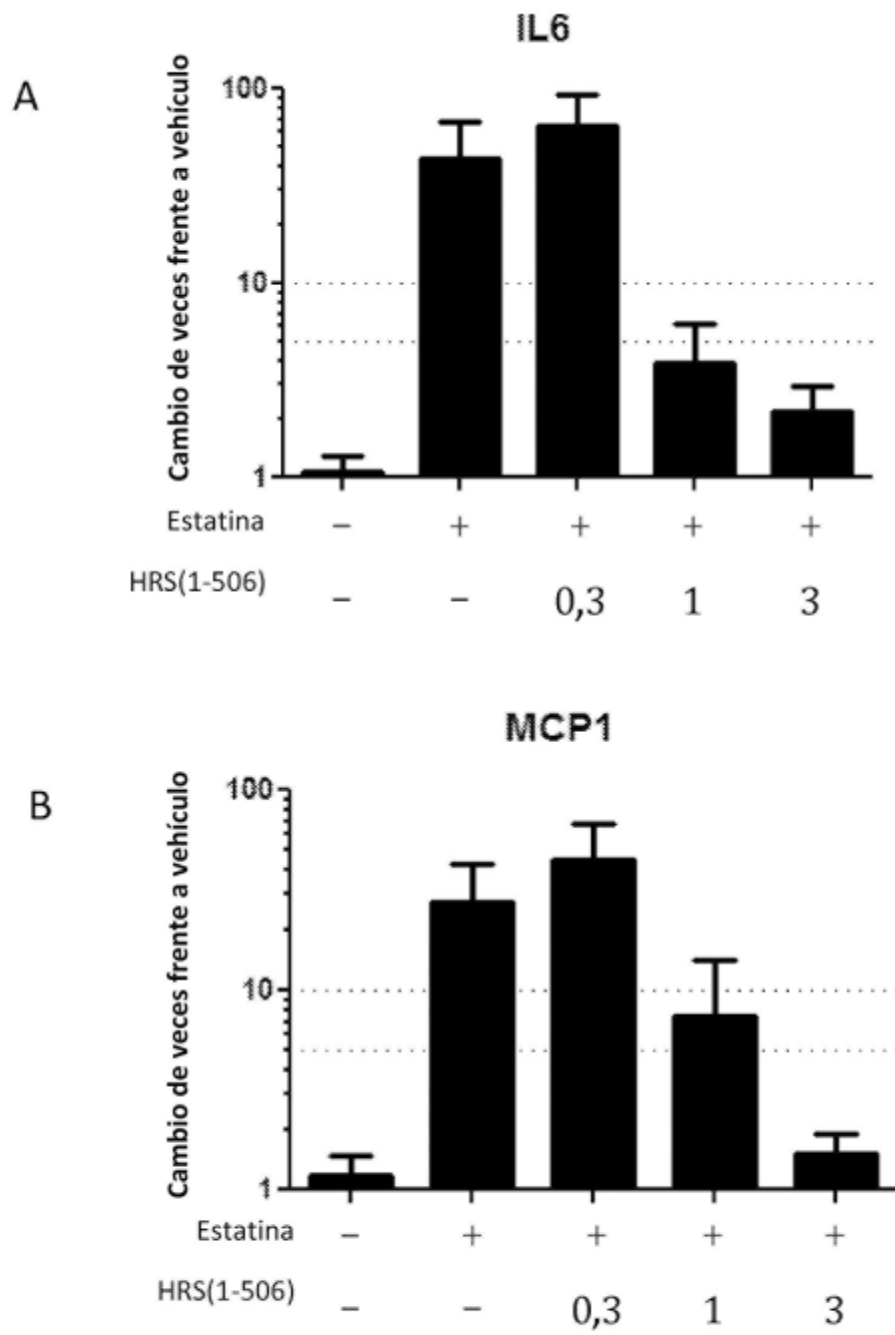


Figura 16

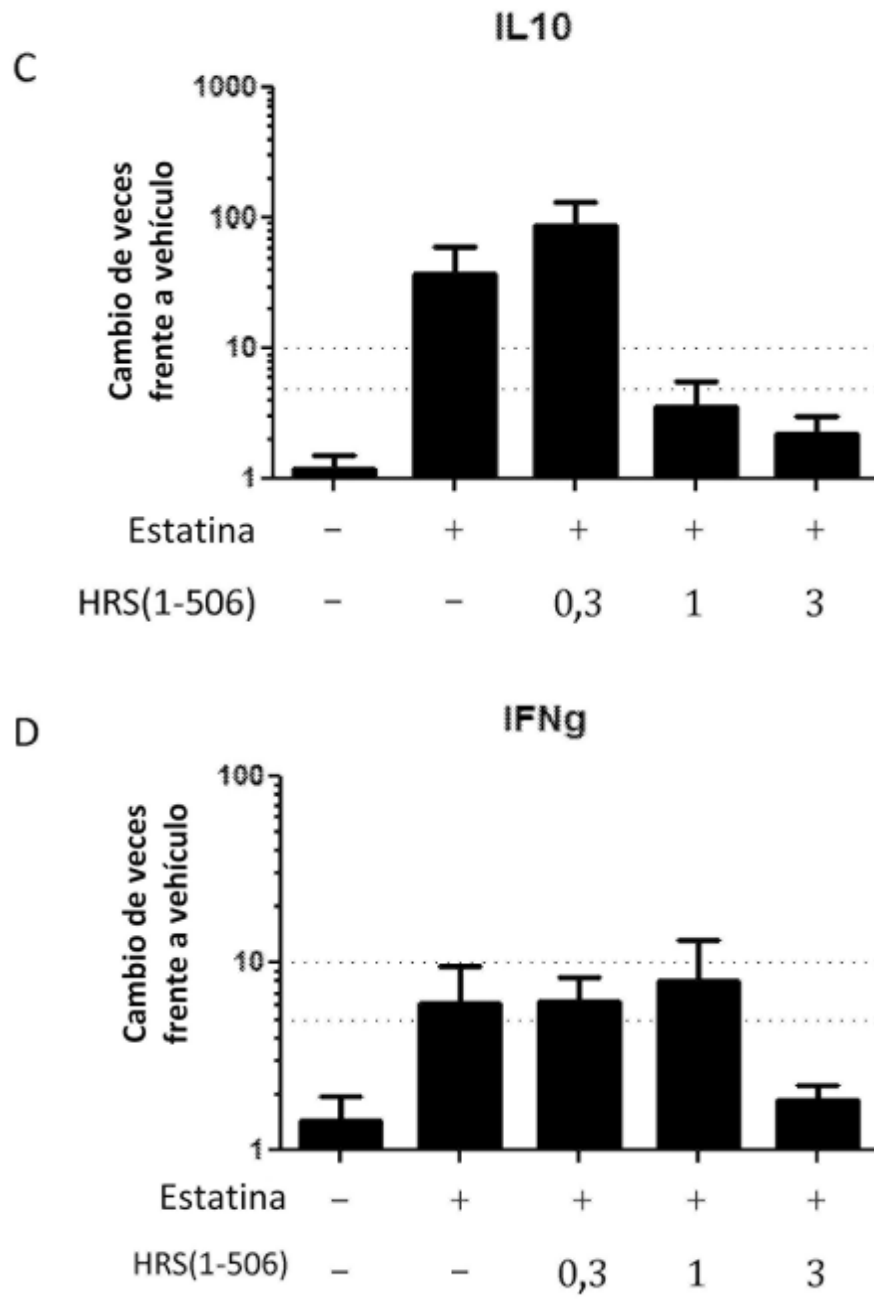


Figura 16

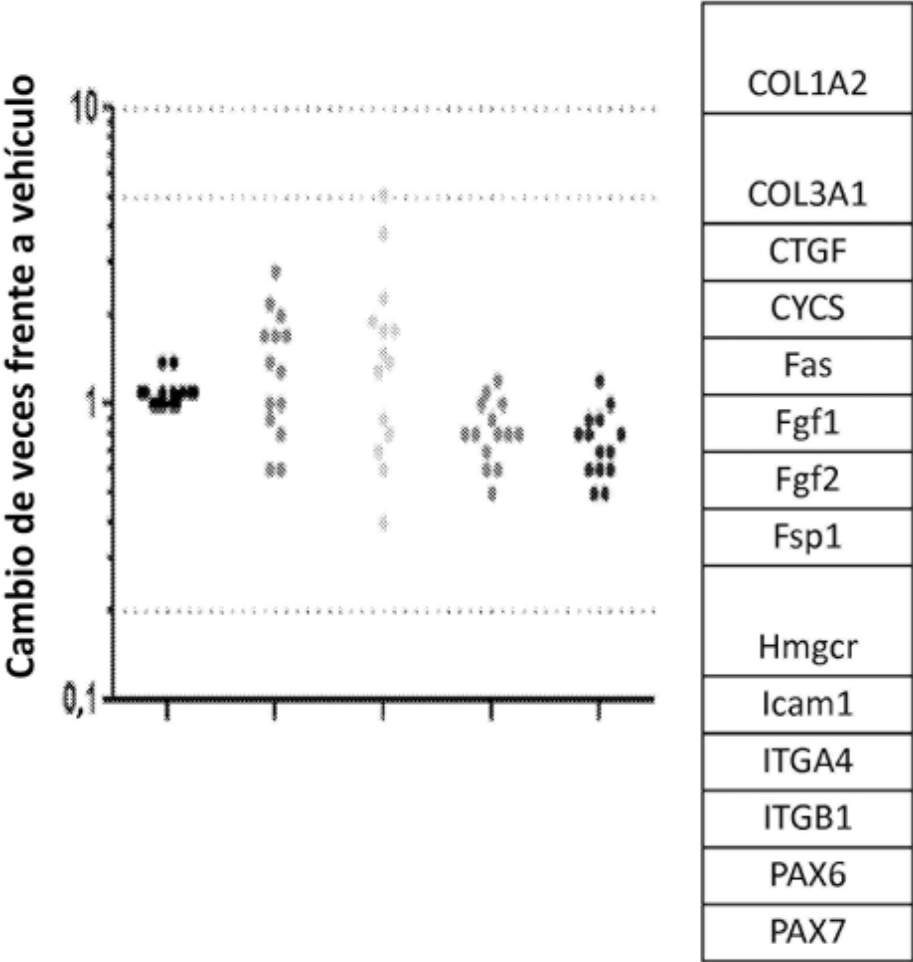


Figura 17

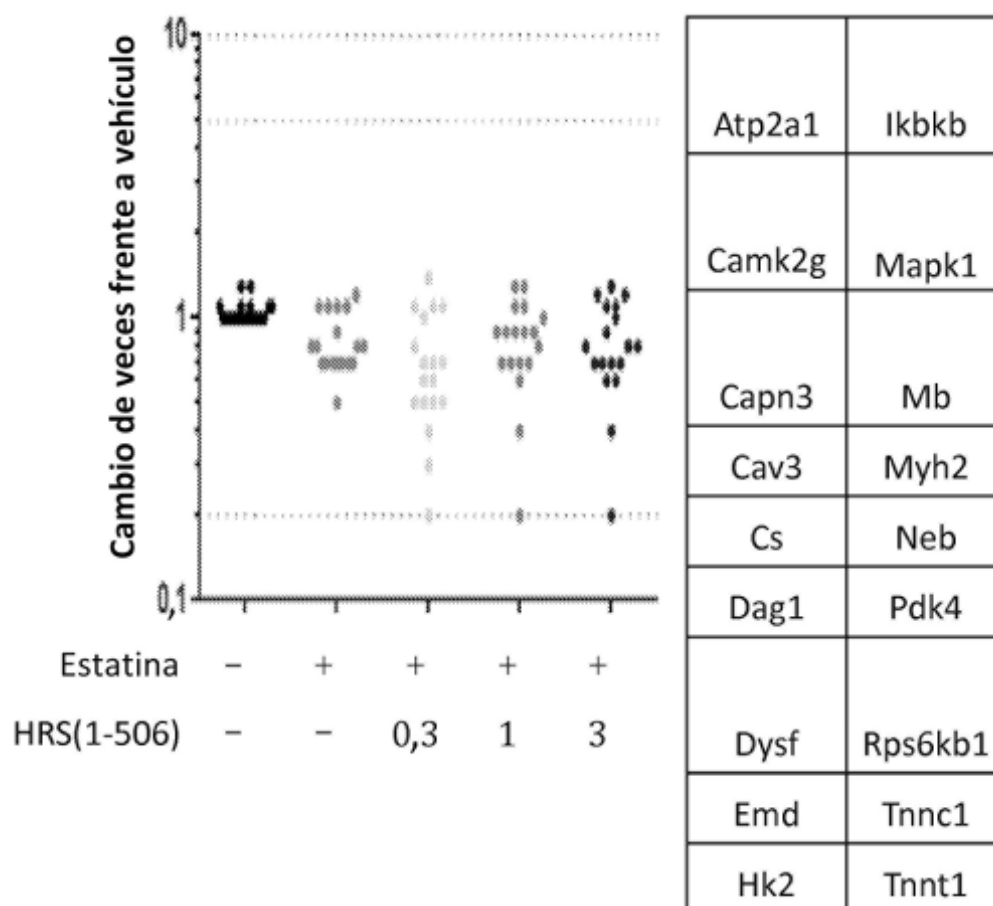


Figura 18

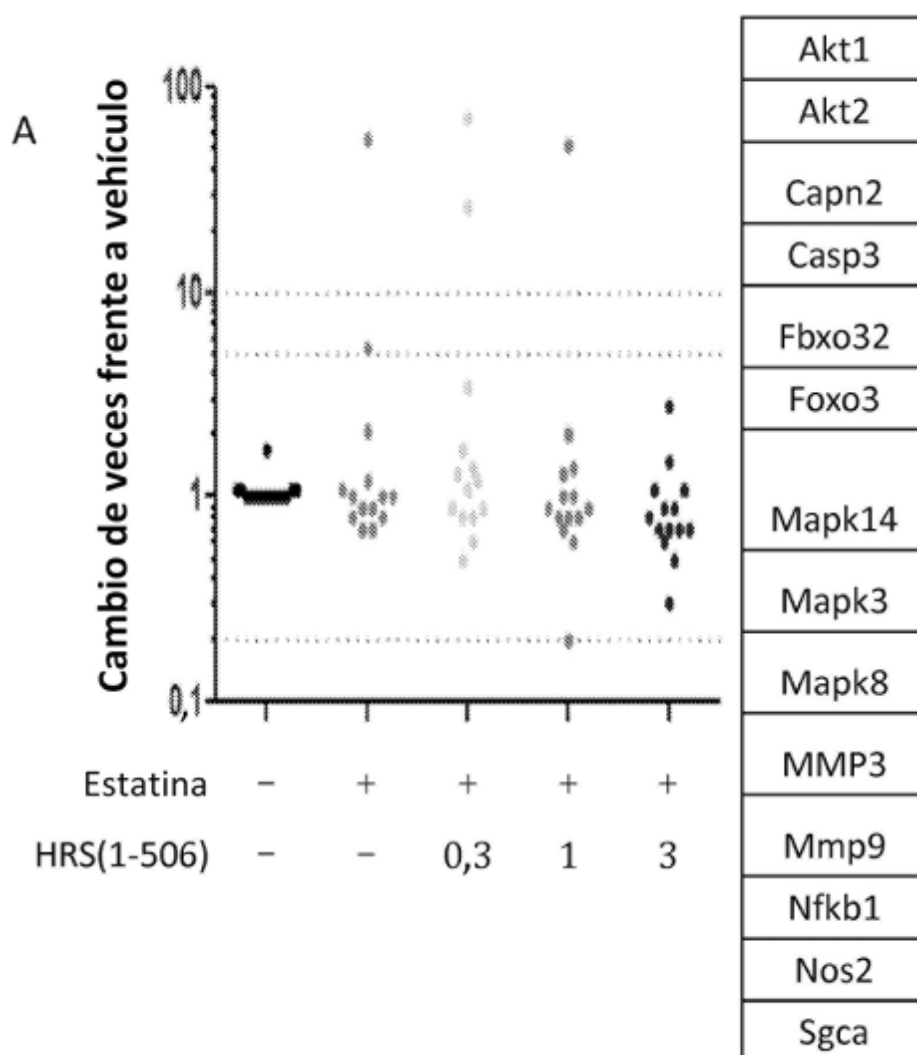


Figura 19

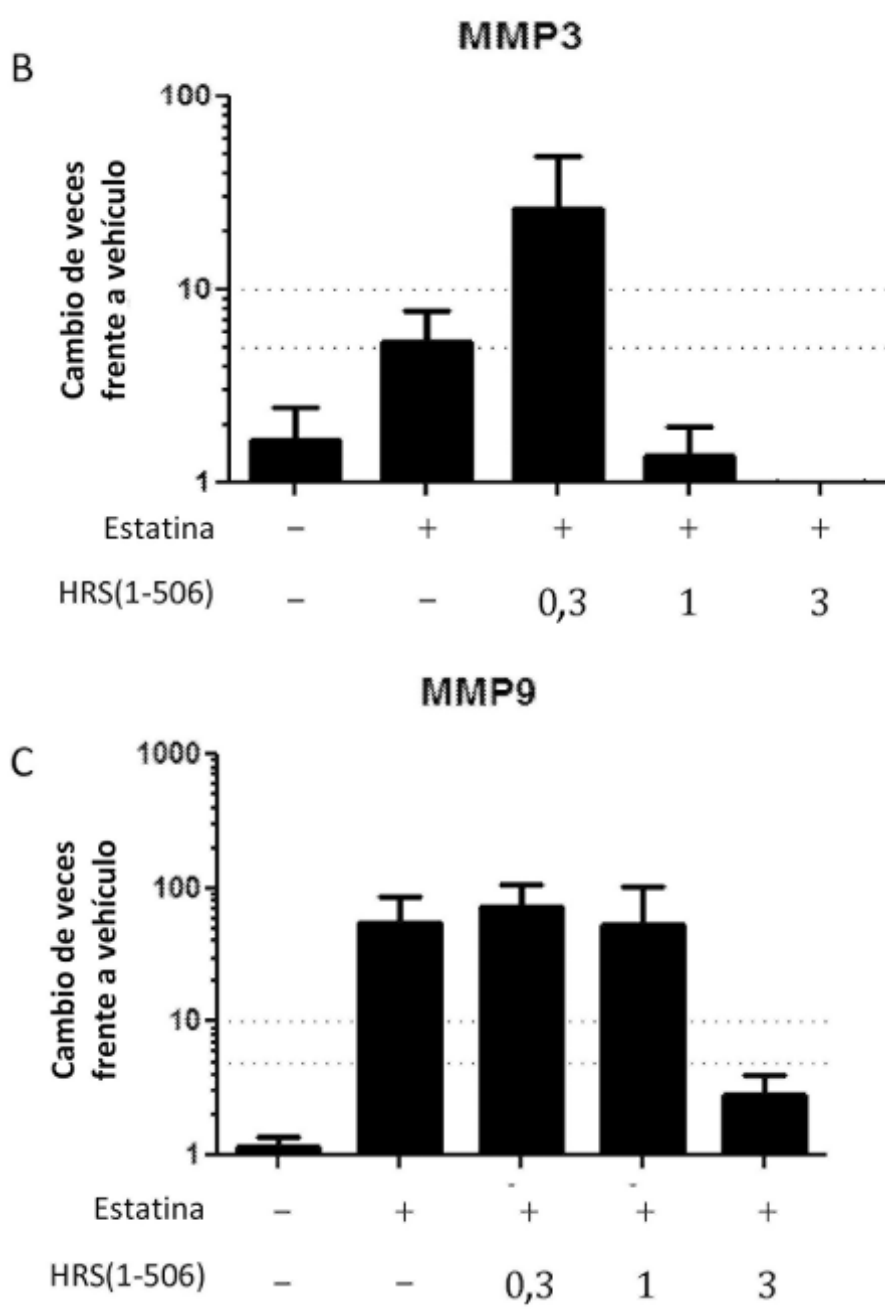


Figura 19

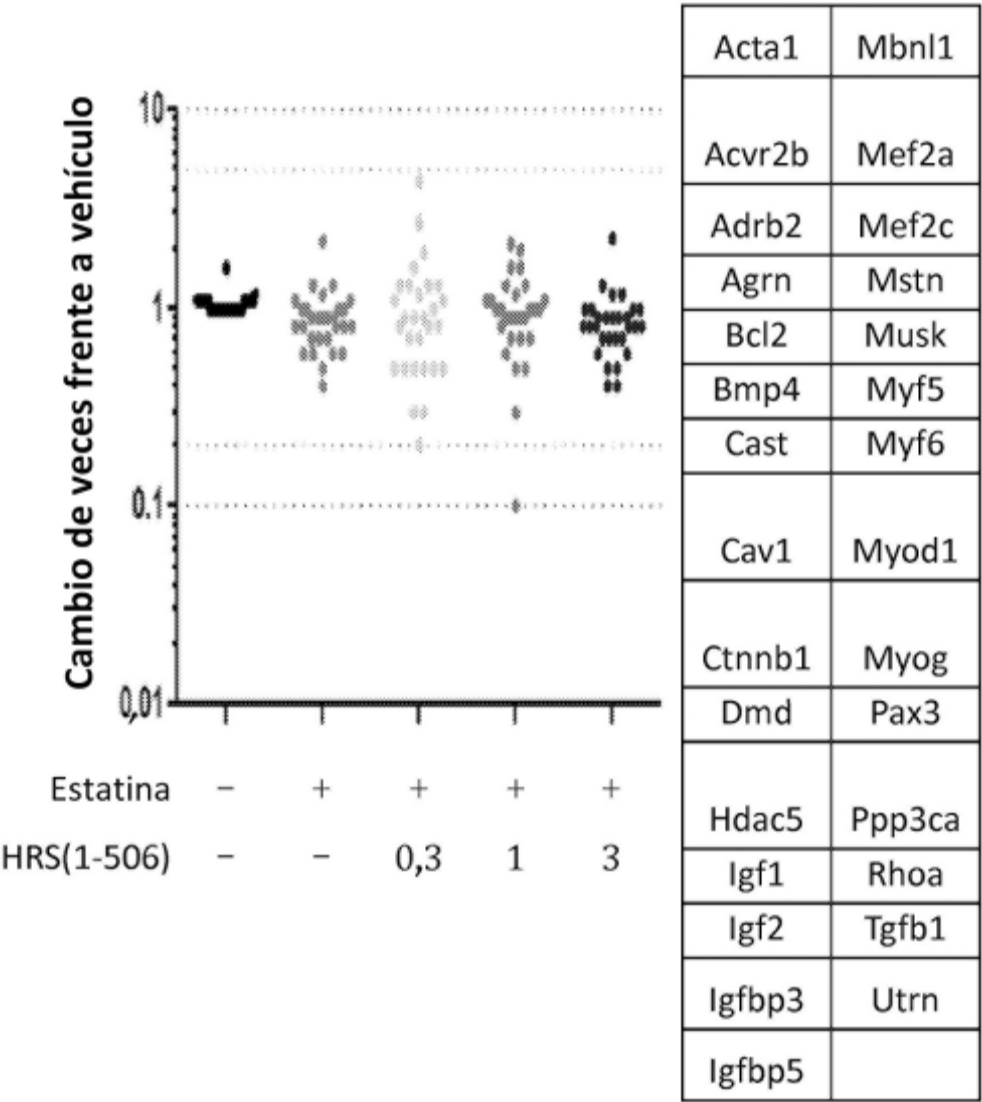


Figura 20

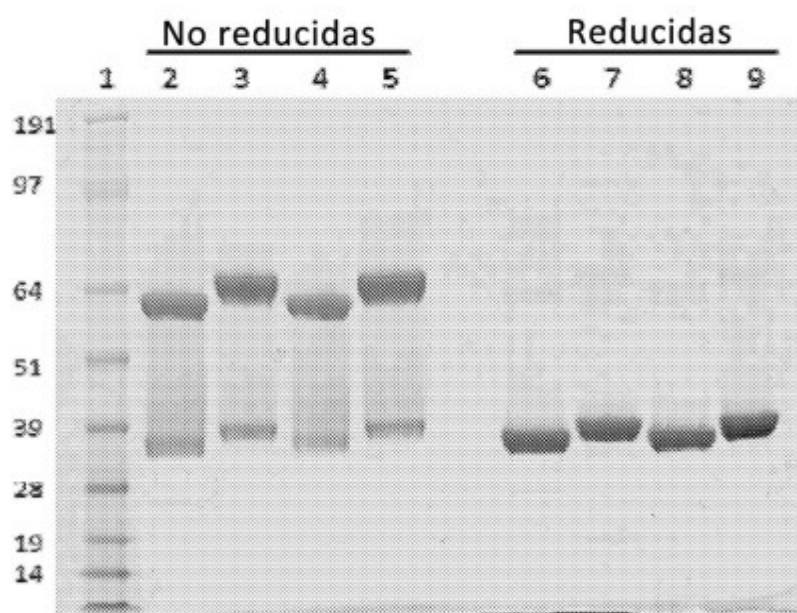


Figura 21

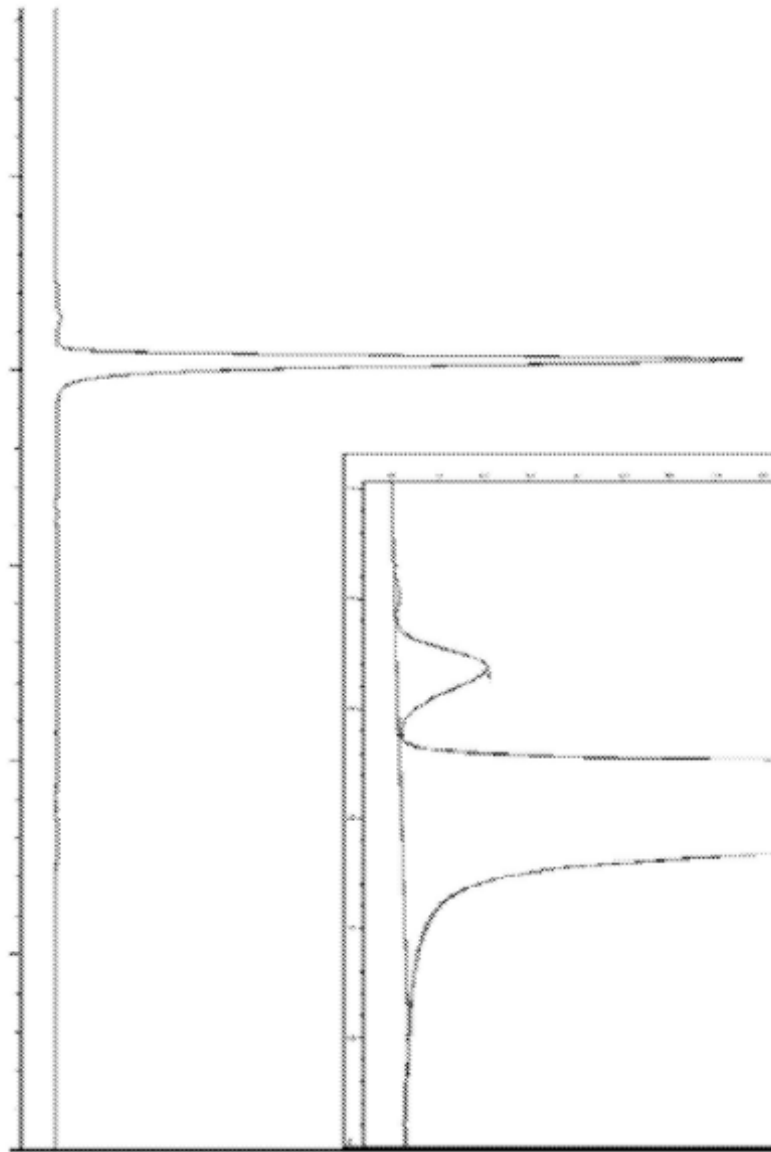


Figura 22

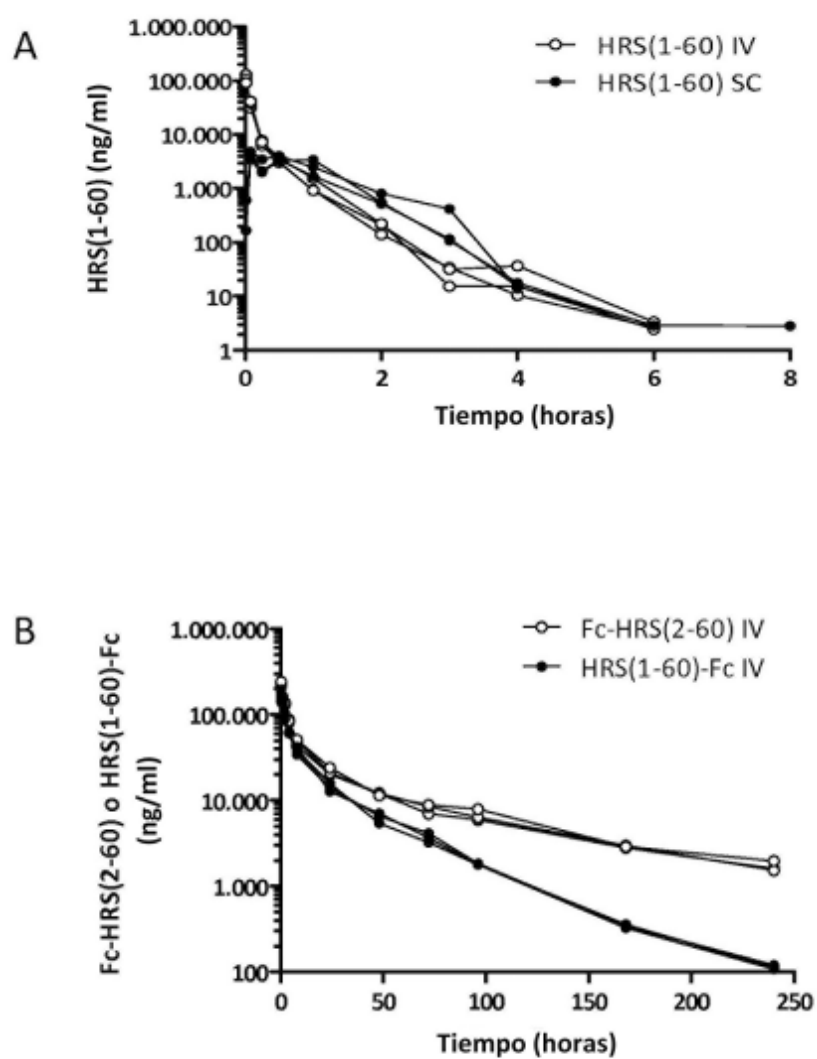


Figura 23

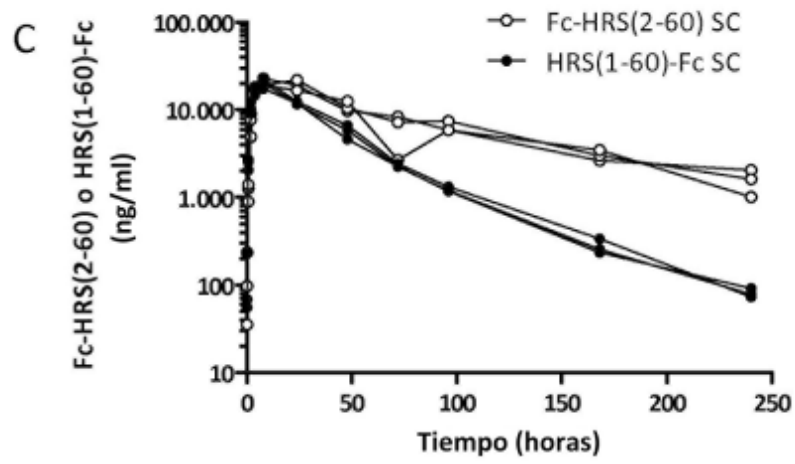


Figura 23

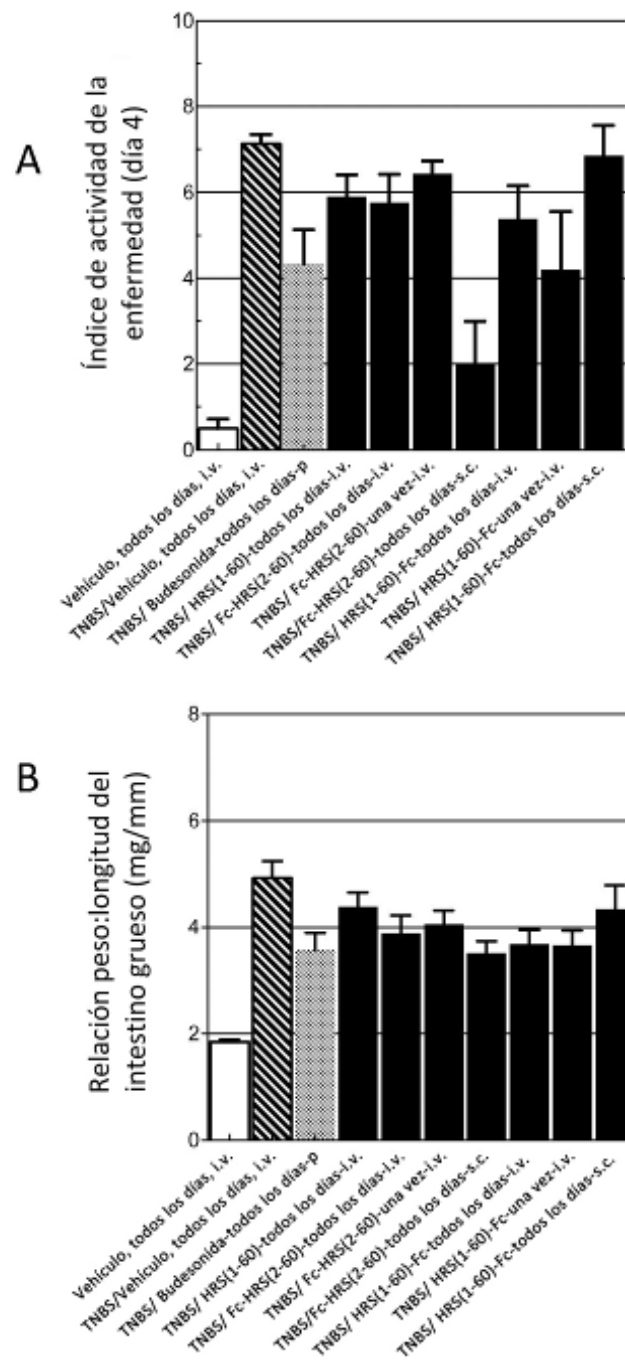


Figura 24

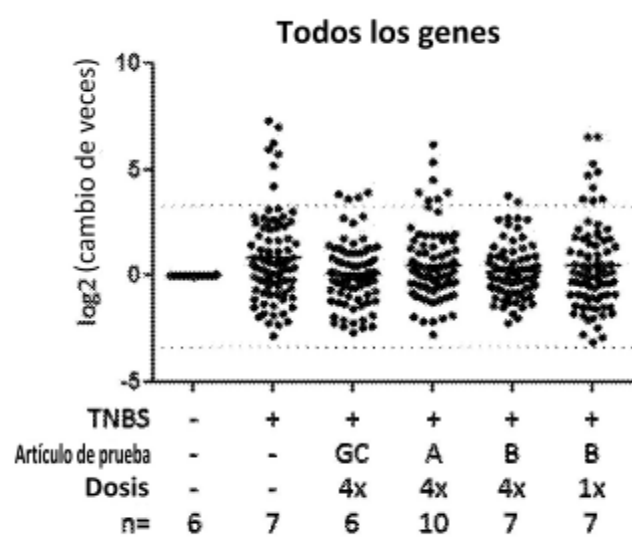


Figura 25

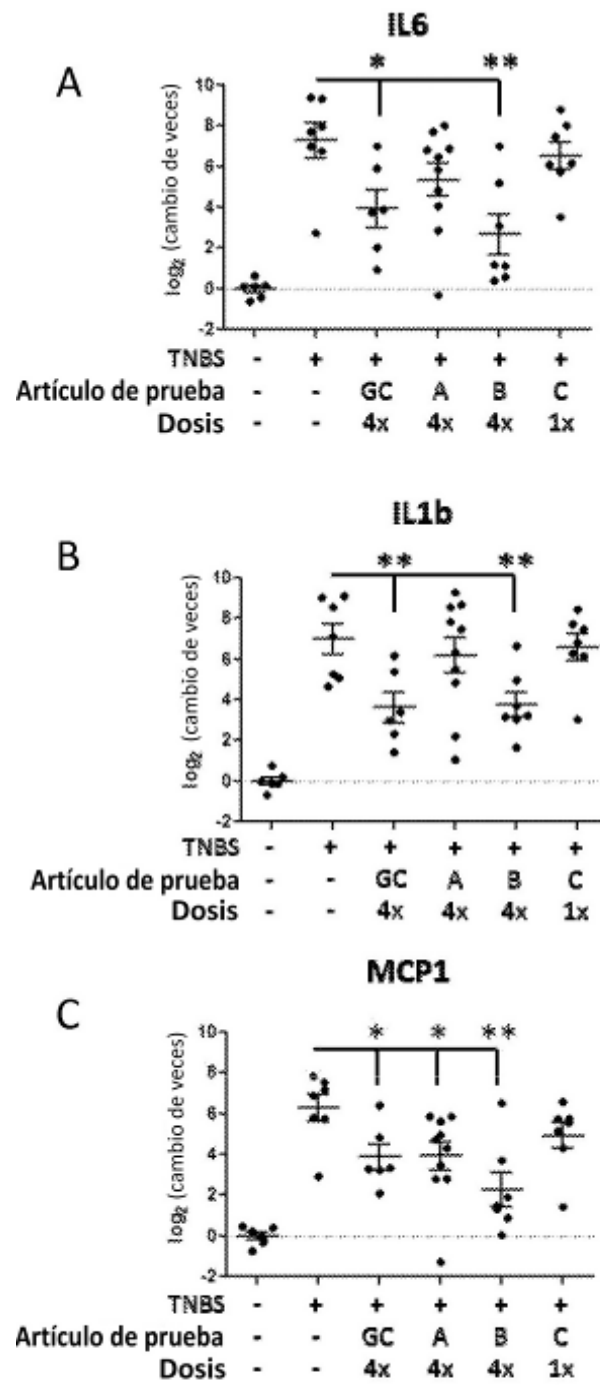


Figura 26

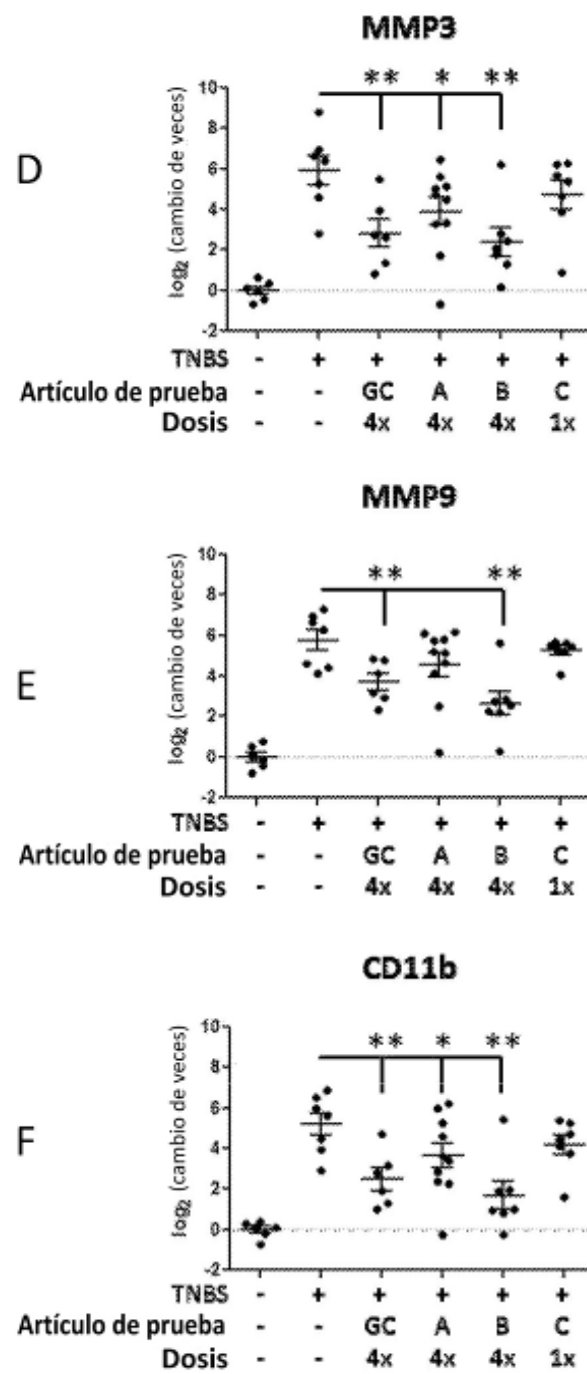


Figura 26

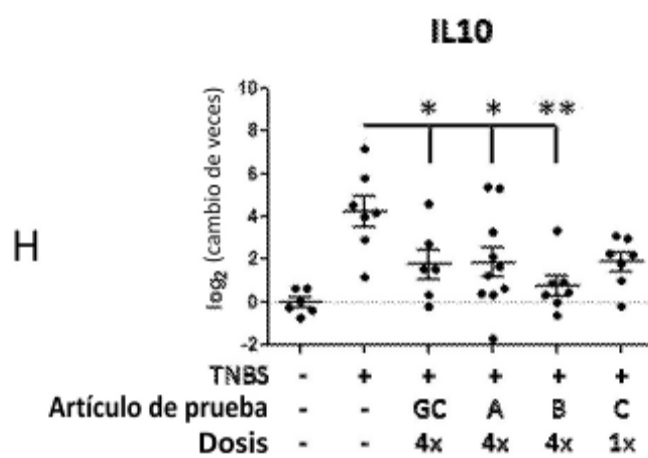


Figura 26

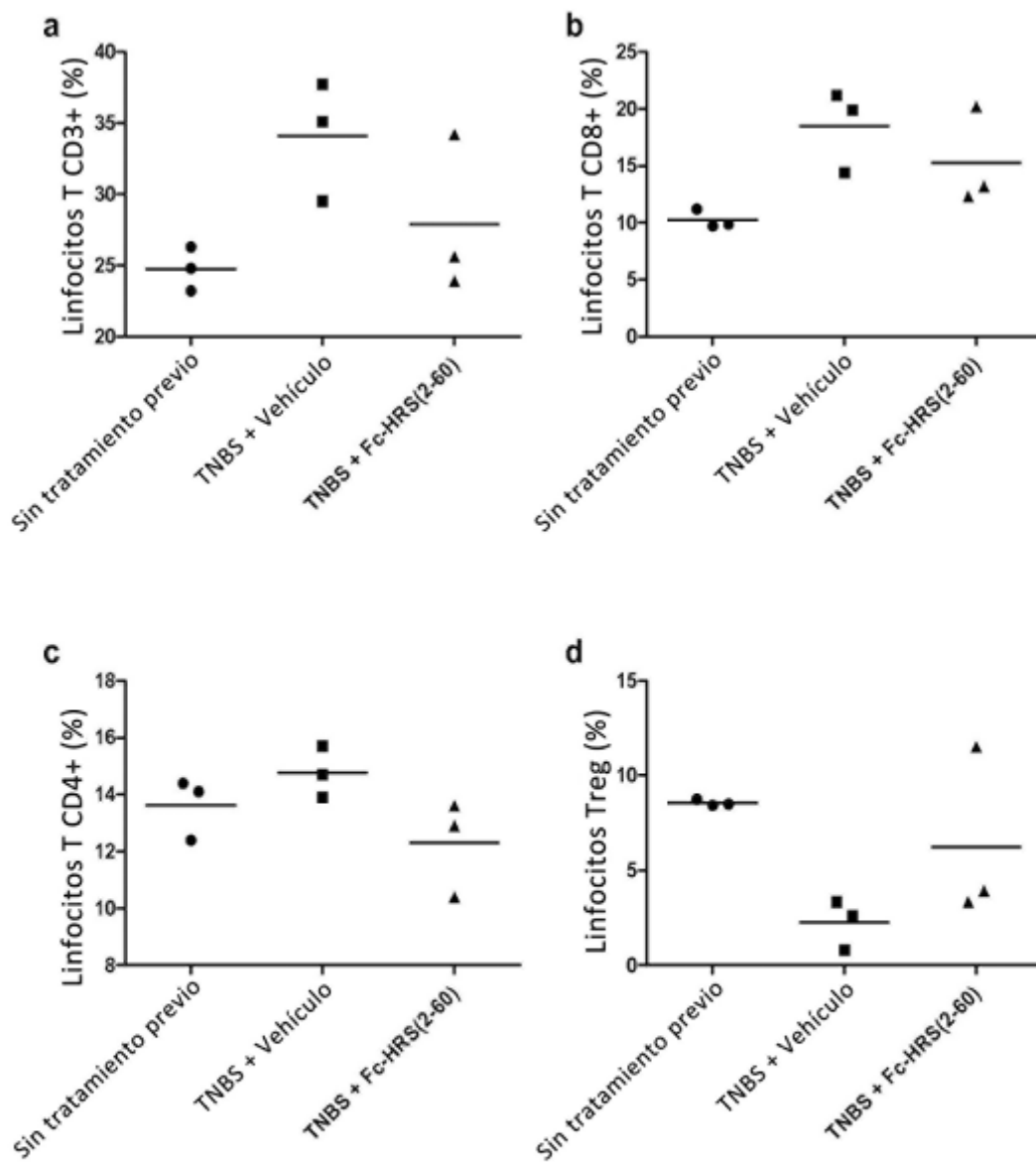


Figura 27