

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 973 864**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
G01N 33/80 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2018 E 19184018 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2023 EP 3587445**

(54) Título: **Composiciones, métodos y/o kits que comprenden un dominio extracelular de CD38 recombinante humano**

(30) Prioridad:

10.08.2017 US 201762543788 P

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

24.06.2024

(73) Titular/es:

GRIFOLS DIAGNOSTIC SOLUTIONS INC.
(100.0%)
4560 Horton Street
Emeryville, CA 94608, US

(72) Inventor/es:

FAVALORO, VINCENZO;
BINDA, MATTEO;
HALL, JOHN A.;
BOOTH, ELIZABETH;
BERRY, JODY y
SCHWIND, PETER

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 973 864 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

Composiciones, métodos y/o kits que comprenden un dominio extracelular de CD38 recombinante humano

5 Listado de secuencias en formato electrónico

La presente solicitud se presenta junto con un listado de secuencias electrónicas como un archivo de texto ASCII a través de EFS-Web. El listado de secuencias electrónicas se proporciona como un archivo titulado SEQLISTCD38PCT.txt, creado y guardado por última vez el 31 de mayo de 2018, el cual tiene un tamaño de 73.000 bytes. La información en el listado de secuencias electrónicas se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

Antecedentes**15 Campo**

La presente divulgación se refiere a una etiqueta ("tag") de oligomerización, proteínas de fusión que comprenden dicha etiqueta de oligomerización y métodos para la oligomerización de proteínas de fusión recombinantes utilizando dicha etiqueta.

20 Descripción de la técnica relacionada

La proteína transmembrana CD38 humana se expresa mucho en cierto mieloma maligno. Los anticuerpos monoclonales anti-CD38 se utilizan como agentes terapéuticos para destruir mieloma múltiple y otros tumores hematológicos. Se divulga una etiqueta que comprende una etiqueta 6-His y una región Fc de inmunoglobulina en el estado de la técnica (Radu Aricescu et al., 2006 - Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography Vol.62, no. 10, p. 1243-1250). También se divulga una etiqueta de oligomerización que comprende una región Fc de inmunoglobulina y el trozo final C-terminal de IgM en el estado de la técnica. (Mekhail et al., 2011 - Scientific Reports, vol. 1, p. 124).

30 Compendio

En algunas realizaciones se proporciona una proteína de fusión. La proteína de fusión comprende un polipéptido recombinante fusionado a la etiqueta de oligomerización de la invención.

35 En algunas realizaciones de la proteína de fusión, la etiqueta de oligomerización es capaz de formar orden superior de dímeros hasta 12meros o 6meros de 2meros y posiblemente un grado superior de oligómeros.

En algunas realizaciones de la proteína de fusión, la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina es SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 15.

40 En algunas realizaciones de la proteína de fusión, la secuencia del polipéptido recombinante se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26.

45 En algunas realizaciones de la proteína de fusión, la secuencia de la proteína de fusión se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, o SEQ ID NO: 21.

50 Se proporciona una etiqueta de oligomerización para una proteína recombinante. La etiqueta de oligomerización comprende una región Fc de inmunoglobulina o un fragmento de la misma y un dominio poli-His.

55 El dominio poli-His tiene 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de histidina.

60 En algunas realizaciones de la etiqueta de oligomerización para una proteína recombinante la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina es SEQ ID NO: 15.

65 En algunas realizaciones de la etiqueta de oligomerización para una proteína recombinante la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina tiene al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones de la etiqueta de oligomerización para una proteína recombinante la secuencia de la etiqueta de oligomerización se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

En algunas realizaciones se proporciona un método para la oligomerización de una proteína de fusión recombinante. El método para la oligomerización de una proteína de fusión recombinante comprende las etapas de:

- 5 a) fusionar genéticamente una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta de oligomerización según la presente invención a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido;
 b) expresar la secuencia de nucleótidos resultante de la etapa a) en una célula huésped;
 c) purificar la proteína de fusión recombinante obtenida en la etapa b).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una realización de un aminoácido diseñado de forma sintética que codifica CD38ecd-Fc-10H recombinante (SEQ ID NO: 7).

10 La figura 2 muestra una realización de un aminoácido diseñado de forma sintética que codifica CD38ecd-10H recombinante (SEQ ID NO: 8).

15 La figura 3 muestra una realización de un aminoácido diseñado de forma sintética que codifica 10H-MB Pt-CD38ecd recombinante (SEQ ID NO: 9).

20 La figura 4 muestra una realización de un aminoácido diseñado de forma sintética que codifica 10Ht-CD38ecd recombinante (SEQ ID NO: 10).

25 La figura 5 muestra una realización de un aminoácido diseñado de forma sintética que codifica 10-MB Pt-epítopos DARA recombinantes (SEQ ID NO: 11).

30 La figura 6 muestra una realización de la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CD38 (CD38ecd) (SEQ ID NO: 1).

35 La figura 7 muestra una realización de la secuencia de aminoácidos de epítopos DARA (SEQ ID NO: 2).

40 La figura 8 muestra una realización de la secuencia de aminoácidos del epítopo DARA (epítopo #1) (SEQ ID NO: 3).

45 La figura 9 muestra una realización de la secuencia de aminoácidos del epítopo DARA (epítopo #2) (SEQ ID NO: 4).

50 La figura 10 muestra una realización de la secuencia de aminoácidos de Fc-10H de ratón (SEQ ID NO: 5).

55 La figura 11 muestra una realización de la secuencia de aminoácidos de 10H-MB Pt (SEQ ID NO: 6).

60 La figura 12 representa un esquema de las diversas proteínas CD38 recombinantes utilizando soportes ("scaffolds") alternativos.

65 La figura 13 muestra los datos relacionados con la identificación de un anticuerpo anti-D título de bajo después de la inhibición de anti-CD38 por CD38ecd-Fc-10H.

70 La figura 14 muestra los datos relacionados con la identificación de anticuerpos inesperados, apenas detectables, después de la inhibición de anti-CD38 por CD38ecd-Fc-10H.

75 La figura 15 muestra los datos relacionados con la inhibición de anti-CD38 por CD38ecd-Fc-10H o rhCD38.

80 La figura 16 muestra una funcionalidad equivalente de pretratamientos con CD38ecd-Fc-10H a diferentes temperaturas y tiempos de incubación.

85 La figura 17 muestra una mejor funcionalidad de CD38ecd-Fc-10H y CD38ecd-flex-Fc-10H frente a CD38ecd-10H.

Descripción detallada

CD38ecd recombinante humano

90 Las realizaciones siguientes relacionadas con CD38ecd humano recombinante no están cubiertas por las reivindicaciones.

95 Daratumumab (DARA) es un anticuerpo monoclonal (Acm) de inmunoglobulina (Ig)G1k humana que se dirige a la proteína transmembrana CD38 que se expresa mucho en células de mieloma maligno (de Weers M, *et al.*, Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of myeloma multiple and other hematological tumors. *J Immunol.* 1 Feb 2011;186(3):1840-8; Lokhorst HM, *et al.*, Targeting CD38 with Daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 24 Sep 2015;373(13):1207-19) y se utiliza para terapia en humanos. En 2016, la monoterapia con DARA fue aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple que habían recibido, al menos, tres líneas de terapia anteriores.

- Se ha descrito que DARA interfiere con ensayos de compatibilidad sanguínea de rutina (Chapuy CI *et al.*, Resolving the DARA interference with blood compatibility testing. *Transfusion*. Jun 2015;55(6 Pt 2):1545-54; Oostendorp M *et al.*, When blood transfusion medicine becomes complicated due to interference by monoclonal antibody therapy. *Transfusion*. Jun 2015;55(6 Pt 2):1555-62). DARA reconoce específicamente el dominio extracelular de CD38 endógeno en la superficie celular de los eritrocitos (RBC), provocando reacciones de falsos positivos en ciertos ensayos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras de plasma de pacientes tratados con DARA producen sistemáticamente reacciones positivas en ensayos anti-globulina indirectos (IAT), tales como ensayos de detección de anticuerpos (cribado), paneles de identificación de anticuerpos, y pruebas cruzadas de globulina anti-humana (AHG). La detección de anticuerpos irregulares en el plasma del paciente se enmascara hasta 6 meses después de la última infusión con DARA. Los anticuerpos inesperados/irregulares, como aloanticuerpos y autoanticuerpos, son los anticuerpos que pueden causar incompatibilidad en transfusiones de sangre. Los anticuerpos irregulares son más comúnmente del tipo IgG. Esta interferencia entorpece las pruebas de pretransfusión de rutina y complica la selección de unidades de RBC adecuadas para pacientes tratados con DARA. Además del DARA, otros dos anticuerpos específicos de CD38 (isatuximab y MOR202) se encuentran en desarrollo clínico y algunos otros están en desarrollo preclínico (van de Donk NW, *et al.* Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunol Rev*. Mar 2016;270(1):95-112).
- Para superar este problema, se han desarrollado y descrito diferentes soluciones. Cada solución tiene sus propias ventajas y desventajas, las cuales se describen en la tabla 1 (Chapuy C.I., *et al.* DARA-DTT Study Group* for the BEST Collaborative. International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion*. Dic 2016;56(12):2964-2972).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos de mitigación de la interferencia de anti-CD38 actuales

Método	Mecanismo de mitigación	Ventajas	Desventajas
DTT ⁶	Desnaturaliza CD38 en células de reactivo	Económico Bastante fácil DTT utilizado habitualmente en muchos bancos de sangre	Debe dar unidades K Siempre falla en la detección de anticuerpos contra: KEL, DO, IN, JMH, KN, LW A menudo falla en la detección de anticuerpos contra: YT, LU, MER2, CROM ¹²
Tripsina ⁶	Escinde CD38 de células de reactivo	Económico Bastante fácil Se detectan anticuerpos contra antígenos del grupo KEL	Se utiliza de forma menos habitual que DTT Siempre falla en la detección de anticuerpos contra: Bp ^a Ch/Rg, XG, IN, JMH, M, N, En ^a TS, Ge2, Ge4, LU, MER2, KN, DO ¹²
Cribado de anticuerpos de células de cordón ⁸	Expresión disminuida de CD38 en células de cordón	Económico Bastante fácil No es necesario ningún tratamiento químico o enzimático	No está disponible comercialmente No es práctico para la identificación de anticuerpos Siempre falla en la detección de anticuerpos contra: Le ^a , Ch/Rg, AnWj, Sd ^a A menudo falla en la detección de anticuerpos contra: Le ^b , P1, Lu ^a , Lu ^b , Yt ^a , JMH, Xg ^a Vel, Bg, KN, DO, Fy3 ¹²
CD38 soluble ^{6,7,13}	Neutralización de anti-CD38	Fácil No se pasan por alto anticuerpos Disponible comercialmente Funcionaría con cualquier anti-CD38	Caro Vida útil de almacenamiento corta Se requiere validación adicional
Idiotipo de anti-CD38 ^{6,7}	Neutralización de anti-CD38	Fácil No se pasan por alto anticuerpos	No disponible comercialmente Se requiere validación adicional Necesitaría un anti-idiotipo diferente para el anti-CD38 de cada fabricante
Emparejamiento de fenotipo	Método no serológico	Llevado a cabo habitualmente en bancos de sangre	Casi nunca los anticuerpos clínicamente significativos podrían pasarse por alto dependiendo de la extensión del emparejamiento El fenotipado inicial debería hacerse antes de empezar con anti-CD38 Casi nunca, incluso con emparejamiento extendido, se puede producir un anticuerpo clínicamente significativo adicional La disponibilidad de las unidades emparejadas y el posible tiempo extendido para obtener
Emparejamiento de genotipo ⁹	Método no serológico	Permite la identificación de individuos a los que le faltan antígenos de alta frecuencia (por ejemplo, Yt ^a) Se puede llevar a cabo después de que se haya comenzado el tratamiento con anti-CD38	Caro Casi nunca, los resultados del genotipo no pueden predecir correctamente el fenotipo Casi nunca, los anticuerpos significativos clínicamente podrían pasarse por alto dependiendo de la extensión del emparejamiento Casi nunca, incluso con el emparejamiento extendido, se puede producir un anticuerpo clínicamente significativo adicional La disponibilidad de unidades emparejadas y posible tiempo extendido para obtener

La neutralización de anti-CD38 por una forma soluble del dominio extracelular de CD38 y/o un fragmento del mismo (sCD38ecd, al que también se denomina en el presente documento sCD38) es un método atractivo porque no daña ningún epítopo en la superficie de los RBC, puede neutralizar cualquier anticuerpo anti-CD38, y su implementación en pruebas de laboratorio de rutina requiere solo la incubación de una muestra de sangre, plasma y/o suero del paciente con sCD38. La principal desventaja es el posible coste elevado de sCD38ecd recombinante. Esta desventaja es subjetiva porque las proteínas recombinantes se utilizan mucho en diversos diagnósticos *in vitro* (IVD) permitiendo que el coste se mantenga alcanzable para el uso rutinario. Una posible desventaja adicional de la utilización de sCD38 es la dilución de la sangre y/o plasma del paciente que tiene lugar cuando se neutraliza anti-CD38 utilizando una solución de sCD38, que podría conducir a no encontrar anticuerpos de grupo sanguíneo irregulares relevantes en un cribado y/o la identificación de anticuerpos posterior. Por lo tanto, es deseable tener sCD38 muy concentrado disponible, de modo que se requieran solo pequeños volúmenes de sCD38 cuando se neutralizan anticuerpos anti-CD38 en una muestra de sangre y/o plasma de un paciente.

Las soluciones alternativas incluyen la utilización de desnaturizantes químicos para tratar los RBC que tienen un efecto muy amplio y no específico. Actualmente, el método a elegir para eliminar la interferencia de DARA es el tratamiento con DTT de los RBC provocando que el CD38 se reduzca, de tal modo que no sea reconocido por los anticuerpos DARA. Sin embargo, este tratamiento también destruye algunos otros antígenos de grupo sanguíneo, contra los cuales ya no pueden detectarse e identificarse anticuerpos sobre las respectivas células. Por ejemplo, el tratamiento de los RBC en un kit de reactivo de eritrocitos, con el agente reductor ditiotreitol (DTT) y rehacer la prueba anulará de forma eficaz la unión de DARA a CD38 en la superficie celular de los eritrocitos. Sin embargo, el DTT inactiva y destruye diversos antígenos en la superficie celular de los eritrocitos rompiendo los enlaces disulfuro de forma no específica, por ejemplo, el sistema Kell de antígenos que son importantes en la hemoclasificación sanguínea y las reacciones de transfusión.

Por el contrario, el sCD38 no daña ningún epítopo en la superficie de los RBC y puede neutralizar cualquier anticuerpo anti-CD38 siempre que el sCD38 comprenda uno o más epítopos que puedan unirse al anticuerpo anti-CD38.

La presente divulgación se refiere a composiciones, métodos y/o kits que comprenden sCD38 recombinante humano y fragmentos del mismo. La presente divulgación también se refiere a composiciones, métodos y/o kits que comprenden sCD38 humano recombinante y fragmentos del mismo expresados en sistemas de expresión eucariotas y/o procariotas.

En algunas realizaciones, el sCD38 recombinante y/o fragmentos del mismo se solubilizan utilizando métodos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los presentes inventores han desarrollado un sCD38 recombinante como bloqueo para interferir con DARA y/u otros anticuerpos anti-CD38 terapéuticos en desarrollo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere al sCD38 recombinante y/o fragmentos del mismo que interfiere con uno o más anticuerpos que se unen a CD38. En algunas realizaciones, el sCD38 recombinante y/o fragmentos del mismo interfiere con uno o más anticuerpos policlonales que se unen a CD38. En algunas realizaciones, el sCD38 recombinante y/o fragmentos del mismo interfieren con uno o más anticuerpos monoclonales que se unen a CD38. En algunas realizaciones, el sCD38 recombinante y/o fragmentos del mismo interfieren con uno o más anticuerpos monoclonales y policlonales que se unen a CD38. En algunas realizaciones, el sCD38 recombinante y/o fragmentos del mismo interfieren con una o más proteínas que se unen a CD38.

En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a la proteína sCD38 recombinante y/o fragmentos de la misma que interfieren con la unión a DARA. En algunas realizaciones, el sCD38 recombinante y/o fragmentos del mismo interfiere con la unión a isatuximab. En algunas realizaciones, el sCD38 recombinante y/o fragmentos del mismo interfieren con la unión a MOR202. En algunas realizaciones, el sCD38 recombinante y/o fragmentos del mismo interfieren con la unión a uno o más de DARA, isatuximab, o MOR202. En algunas realizaciones, el sCD38 y/o un fragmento del mismo se refieren a la proteína CD38 humana y/o fragmentos de la misma. En algunas realizaciones, el sCD38 y/o un fragmento del mismo se refieren a la proteína CD38 no humana. Los ejemplos no limitantes de fuentes no humanas de CD38 se incluyen perros, gatos, conejo, ratón, conejillo de Indias, mono, vaca, oveja, cabra, cebra, etc.

En algunas realizaciones, CD38ecd (expresado como sCD38) es como se divulga en la figura 6. En algunas realizaciones, CD38ecd (expresado como sCD38) es como se divulga en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, CD38ecd es un fragmento de proteína CD38 que comprende los residuos 45 a 300 (SEQ ID NO: 1) de la secuencia de aminoácidos de CD38 humano según UniProt # P28907. En algunas realizaciones, el CD38ecd es un fragmento de la parte de CD38 que se prevé que esté expuesto en una superficie celular cuando se expresa de forma natural en una superficie celular. En algunas realizaciones, el CD38ecd es el supuesto dominio extracelular de la proteína CD38 cuando se expresa de forma natural en una superficie celular.

En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a la expresión de CD38ecd (SEQ ID NO: 1) como sCD38, en donde CD38ecd (SEQ ID NO: 1) es parte de la proteína CD38 humana que se prevé que esté expuesta en una superficie celular. En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a la expresión de un fragmento

de CD38ecd (SEQ ID NO: 1) como sCD38, en donde CD38ecd (SEQ ID NO: 1) es parte de la proteína CD38 humana que se prevé que esté expuesta en una superficie celular.

Para un experto en la materia sería concebible que el CD38ecd recombinante o un fragmento del mismo se pueda expresar utilizando uno o más sistemas de expresión conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes incluyen sistemas de expresión bacterianos, y/o sistemas de expresión eucariotas entre incluyendo, pero no limitados a, células de insecto, levadura, y tipos de células de mamífero.

En algunas realizaciones, el sistema de expresión es un sistema de expresión eucariota que comprende células de mamífero, células de levadura, células de insecto, etc. En algunas realizaciones, el sistema de expresión eucariota se selecciona del grupo que consiste en células CHO, HEK, BHK, NSO, Sp2/0, COS, C127, HT-10780, PER.C6, HeLa y/o Jurkat. En algunas realizaciones, las ventajas no limitantes de un sistema de expresión eucariota (por ejemplo, que comprende células de mamífero) relacionadas con la expresión de sCD38 o fragmentos del mismo incluyen el plegamiento correcto de sCD38 o fragmentos del mismo para que se unan anticuerpos anti-CD38, modificaciones postraduccionales correctas, separación adecuada en los compartimentos de las vías secretoras, funcionalidad adecuada, etc.

En algunas realizaciones, sCD38 se expresa como una proteína de fusión que comprende una región Fc de inmunoglobulina IgG1, tal como se muestra en la figura 1 (a la que se denomina en el presente documento CD38ecd-Fc-10H; SEQ ID NO: 7). En algunas realizaciones, CD38ecd-Fc-10H es una proteína recombinante codificada por un ácido nucleico diseñado de forma sintética que codifica un fragmento de una región constante de inmunoglobulina IgG1. En algunas realizaciones, CD38ecd-Fc-10H es una proteína recombinante codificada por un ácido nucleico diseñado de forma sintética que codifica un fragmento de una región constante de inmunoglobulina IgG2. En algunas realizaciones, CD38ecd-Fc-10H es una proteína recombinante codificada por un ácido nucleico diseñado de forma sintética que codifica un fragmento de una región constante de inmunoglobulina IgG3. En algunas realizaciones, CD38ecd-Fc-10H es una proteína recombinante codificada por un ácido nucleico diseñado de forma sintética que codifica un fragmento de una inmunoglobulina de cualquiera de los isotipos anteriores de IgG de región constante con una región bisagra alterada de tal modo que se expresa una fusión Fc monomérica. En algunas realizaciones, CD38ecd-Fc-10H comprende CD38ecd fusionado al extremo N-terminal de SEQ ID NO: 5 (Fig. 10) que comprende un fragmento de una región constante de inmunoglobulina IgG que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, que está fusionado en el extremo C-terminal a una etiqueta de 10 histidinas y un codón de terminación. En algunas realizaciones, CD38ecd-Fc-10H se expresa en una superficie celular. En algunas realizaciones, la región constante de IgG1 murina mejora uno o más de expresión, solubilidad, y estabilidad de una proteína expresada. En algunas realizaciones, la región constante de IgG1 murina mejora uno o más de expresión, solubilidad, y estabilidad de una proteína expresada en la superficie celular. En algunas realizaciones, la etiqueta His permite la purificación de CD38ecd-Fc-10H mediante purificación por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC).

Tal como se utiliza en el presente documento, "ácido nucleico" puede estar basado en ADN, ARN, o una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes incluyen plásmidos, cósmidos, fagos, vectores virales, vectores adenovirales, minicírculos, ácidos nucleicos modificados, análogos de ácido nucleico, etc., que son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, se diseña un ácido nucleico para la expresión eficaz de una proteína, péptido o ambos en un sistema de expresión eucariota, un sistema de expresión procariota, o ambos. También están abarcados los vectores de vacuna basados en ácidos nucleicos. Los ejemplos no limitantes incluyen vectores de vacuna de ADN, vectores de vacuna de ARN, vectores de vacuna basados en virus (por ejemplo, vectores de vacuna basados en virus adenoasociados), etc.

Sin vincularse a ninguna teoría, en la técnica se cree que el estado natural de CD38 en una membrana es dimérico y/o tetramérico (Bruzzone S *et al.* Dimeric and tetrameric isoforms of catalytically active transmembrane CD38 in transfected HeLa cells. *FEBS Lett.* 21 Ago 1998;433(3):275-8). En algunas realizaciones, CD38ecd-Fc-10H se expresa como una proteína dimérica. En algunas realizaciones, la proteína dimérica es un homodímero de CD38ecd-Fc-10H. En algunas realizaciones, CD38ecd-Fc-10H puede expresarse como una proteína oligomérica que comprende más de dos copias de CD38ecd-Fc-10H. En algunas realizaciones, CD38ecd-Fc-10H se expresa como una proteína oligomérica que comprende de dos copias de CD38ecd-Fc-10H a 12 copias de CD38ecd-Fc-10H. En algunas realizaciones, la etiqueta His permite la purificación de CD38ecd-Fc-10H mediante purificación por IMAC.

En algunas realizaciones, sCD38 se expresa como una proteína de fusión, tal como se muestra en la figura 2 (denominada en el presente documento CD38ecd-10H; SEQ ID NO: 8). En algunas realizaciones, CD38ecd-10H es una proteína recombinante codificada por un ácido nucleico diseñado de forma sintética que codifica CD38ecd con una etiqueta His (es decir, una etiqueta que comprende 10 residuos de histidina). En algunas realizaciones, la etiqueta His permite la purificación de CD38ecd-10H mediante purificación por IMAC.

En algunas realizaciones, la actividad del CD38ecd-Fc-10H oligomérico es mejor que la actividad del CD38ecd-10H monomérico en solución, sobre una superficie sólida, o ambos. En algunas realizaciones, "actividad" se refiere a la capacidad de sCD38 para neutralizar un anticuerpo anti-CD38. En algunas realizaciones, "actividad" se refiere a la capacidad de sCD38 de neutralizar uno o más efectos relacionados con un anticuerpo anti-CD38 sobre una superficie sólida o en solución o ambos. En algunas realizaciones, la eficacia/eficiencia de la "actividad" varía desde aproximadamente >70 % hasta aproximadamente el 100 %. En algunas realizaciones, la eficacia/eficiencia de la "actividad" es de aproximadamente el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o 100%, o un valor en un intervalo definido por cualquiera de dos de los valores definidos anteriormente. En algunas realizaciones, la eficacia/eficiencia de la "actividad" varía desde aproximadamente >90 % hasta el 100 %. En algunas realizaciones, la eficacia/eficiencia de la "actividad" es aproximadamente >90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 98,5, 99, 99,5, o el 100 %, o un valor en un intervalo definido por cualquiera de dos de los valores definidos anteriormente.

En algunas realizaciones, sCD38 se expresa en un sistema de expresión bacteriano. En algunas realizaciones, las ventajas no limitantes de sistema de expresión bacteriano incluyen el coste inferior aun manteniendo la funcionalidad de una proteína eucariota. En algunas realizaciones, el sistema de expresión es un sistema de expresión bacteriano. En algunas realizaciones, sCD38 se expresa como una proteína de fusión, tal como se muestra en la figura 3 (denominada en el presente documento 10H-MBpt-CD38ecd; SEQ ID NO: 9). En algunas realizaciones, 10H-MBpt-CD38ecd es una proteína recombinante codificada por un ácido nucleico diseñado de forma sintética que codifica CD38ecd fusionado en su extremo N-terminal a una etiqueta 10H-MBpt (SEQ ID NO: 6; figura 11, o SEQ ID NO: 19) que comprende 10 residuos de histidina y la proteína de unión a maltosa (MBP) bacteriana entera (Uniprot # P0AEX9; residuos de aminoácidos 29 a 393). En algunas realizaciones, la etiqueta de 10 histidinas se utiliza para la purificación por IMAC. En algunas realizaciones, la MBP mejora uno o más de expresión, solubilidad, o plegamiento.

En algunas realizaciones, 10H-MBpt-CD38ecd comprende una secuencia de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (Tobacco Etch Virus (TEV)). En algunas realizaciones, 10H-MBpt-CD38ecd comprende una secuencia de escisión de la proteasa del TEV entre la MBP y CD38ecd (Fig. 3). En algunas realizaciones, la secuencia de escisión de la proteasa del TEV entre la MBP y CD38ecd permite la escisión de 10H-MBP de CD38ecd produciendo CD38ecd purificado sin ninguna secuencia adicional.

También se contemplan uno o más de otros sitios de escisión de proteasas y no proteasas. Los ejemplos no limitantes incluyen la proteasa el virus de la fiebre aftosa del ganado (Food-and-mouth disease (FMDV)), la proteinasa Arg-C, la endopeptidasa Asp-N, BNPS-Skatole, Caspasas, Quimotripsina de alta especificidad, Quimotripsina de baja especificidad, Clostriptípsina (Clostridiopeptidasa B), CNBr, Enteroquinasa, Factor Xa, ácido fórmico, Glutamyl endopeptidasa, GranzymeB, Hidroxilamina, ácido yodosobenzoico, LysC, LysN, NTCB (ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico), elastasa de neutrófilos, Pepsina, Prolina-endopeptidasa, Proteinasa K, peptidasa I de Estafilococo, Termolisina, Trombina, Tripsina, y otras enzimas específicas de sitio conocidas por cualquier experto en la materia.

En algunas realizaciones, sCD38 se expresa como una proteína de fusión, tal como se muestra en la figura 4 (denominada en el presente documento 10Ht-CD38ecd; SEQ ID NO: 10). En algunas realizaciones, 10Ht-CD38ecd es una proteína recombinante codificada por un ácido nucleico diseñado de forma sintética que codifica CD38ecd fusionado en su extremo N-terminal con una etiqueta que comprende 10 residuos de histidina. En algunas realizaciones, la etiqueta de 10 histidinas se utiliza para purificación por IMAC. En algunas realizaciones, 10H-CD38ecd comprende una secuencia de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV). En algunas realizaciones, 10H-CD38ecd comprende una secuencia de escisión de la proteasa del TEV entre 10H y CD38ecd (Fig. 4). En algunas realizaciones, la secuencia de escisión de la proteasa del TEV entre 10H y CD38ecd permite escindir 10H de CD38ecd produciendo CD38ecd purificado sin ninguna secuencia adicional.

En algunas realizaciones, sCD38 se expresa como una proteína de fusión, tal como se muestra en la figura 5 (denominada en el presente documento 10H-MBpt-DARAepítopos; SEQ ID NO: 11). En algunas realizaciones, 10H-MBpt-DARAepítopos es una proteína recombinante codificada por un ácido nucleico diseñado de forma sintética que comprende la secuencia de aminoácidos (desde el residuo 230 al 280 de Uniprot # P28907; tal como se muestra en SEQ ID NO: 2) de CD38 humano que comprende dos epítopos DARA fusionados en su extremo N-terminal con una etiqueta de 10 histidinas y la proteína de unión a maltosa (MBP), tal como se muestra en la figura 5. En algunas realizaciones, los dos epítopos DARA son epítopos DARAepítopo #1 (Uniprot # P28907 desde el residuo 235 al 246; tal como se muestra en SEQ ID NO: 3) y DARAepítopo #2 (Uniprot # P28907 desde el residuo 267 al 280; tal como se muestra en SEQ ID NO: 4).

En algunas realizaciones, uno o más epítopos de sCD38 pueden unir un anticuerpo anti-CD38 con una afinidad medible de aproximadamente 10e-6 (afinidad de péptido) a 10e-10 (afinidad de anticuerpo muy fuerte).

En algunas realizaciones, se utiliza una etiqueta de 10 histidinas para la purificación por IMAC. En algunas realizaciones, 10H-MBpt-DARAepítopos comprende una secuencia de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV). En algunas realizaciones, 10H-MBpt-DARAepítopos comprende una secuencia de escisión de la proteasa del TEV entre MBP y DARAepítopos (Fig. 5). En algunas realizaciones, la secuencia de escisión de la proteasa del TEV entre MBP y DARAepítopos permite escindir 10H-MBP de DARAepítopos produciendo

DARAepítopos purificado sin ninguna secuencia adicional. En algunas realizaciones, la MBP mejora uno o más de expresión, solubilidad, o plegamiento.

- 5 En algunas realizaciones, el fragmento de sCD38 es uno o más epítopos en CD38ecd a los que se han unido uno o más anticuerpos anti-CD38 policlonales y/o monoclonales. En algunas realizaciones, el tamaño del sCD38 y/o el fragmento del mismo varía desde aproximadamente 5 aminoácidos hasta aproximadamente 300 aminoácidos. En algunas realizaciones, el tamaño varía desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 150 aminoácidos. En algunas realizaciones, el tamaño es de aproximadamente 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 o 350 aminoácidos, o un valor en un intervalo definido por dos valores cualquiera de los mencionados anteriormente.
- 10 10 También se contemplan una o más de otras etiquetas para la purificación, solubilización, detección, etc. Los ejemplos no limitantes incluyen GST, SUMO, AviTag, etiqueta calmodulina, poliglutamato, etiqueta E, etiqueta FLAG, etiqueta HA, etiqueta His, etiqueta Myc, etiqueta NE, etiqueta S, etiqueta SBP, Softag 1, Softag 3, etiqueta Strep, etiqueta TC, etiqueta V5, etiqueta VSV, etiqueta Xpress, Isopeptag, SpyTag, SnoopTag, proteína portadora de carboxilo de biotina (BCCP), etiqueta de Glutation-S-transferasa, etiqueta de proteína fluorescente verde, otras etiquetas de proteínas fluorescentes, HaloTag, etiqueta de proteína de unión a maltosa, etiqueta Nus, etiqueta tioredoxina, etiqueta Fc, etiquetas intrínsecamente desordenadas diseñadas que contienen aminoácidos promotores de desorden (por ejemplo, P, E, S, T, A, Q, G), etiqueta Ty, etc.
- 15 20 La presente divulgación se refiere a una o más composiciones, métodos y/o kits que comprenden una cualquiera o más de las realizaciones de sCD38 y/o fragmentos del mismo descritas en el presente documento y variantes de las mismas.
- 25 25 En algunas realizaciones, una o más composiciones, métodos y/o kits que comprenden sCD38 y/o fragmentos del mismo se refieren al pretratamiento de sangre, suero y/o plasma universal. En algunas realizaciones, el pretratamiento mitiga cualquier interferencia por anticuerpo anti-CD38 en la muestra en la detección y/o identificación de anticuerpos irregulares, así como otros anticuerpos mediante una o más técnicas conocidas por un experto en la materia.
- 30 30 En algunas realizaciones, la interferencia por un anticuerpo anti-CD38 comprende uno o más de interferencia con ensayos de compatibilidad sanguínea, interferencia con terapia de anticuerpos, aglutinación de eritrocitos, interferencia con ensayos de pretransfusión sanguínea, y similares.
- 35 35 En algunas realizaciones, el pretratamiento neutraliza cualquier anticuerpo anti-CD38 para permitir la detección y/o identificación de anticuerpos irregulares en la muestra, así como otros anticuerpos por una o más técnicas conocidas por un experto en la materia. Los ejemplos no limitantes de una o más técnicas conocidas por un experto en la materia incluyen ensayos en tubos convencionales, multitarjeta ("multicard"), ensayos de adherencia de eritrocitos en fase sólida, tecnologías en gel, cualquier otra tecnología actual o futura para la detección/identificación de anticuerpos irregulares.
- 40 40 45 La mitigación de la interferencia por y/o la neutralización del anticuerpo anti-CD38 por el pretratamiento permite la detección y/o identificación de anticuerpos irregulares, así como otros anticuerpos que son relevantes e importantes para los ensayos de compatibilidad. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la neutralización por sCD38 y/o fragmentos del mismo de anti-CD38 en una muestra de plasma, sangre y/o suero se puede combinar con usos diagnósticos, por ejemplo, cribado de anticuerpos, identificación de anticuerpos de grupo sanguíneo irregulares, etc.
- 50 50 55 En algunas realizaciones, sCD38 y/o fragmentos del mismo se pueden utilizar como un reactivo de pretratamiento en el cribado de sangre, cribado de plasma, cribado de suero, o una combinación de los mismos para anticuerpos irregulares, así como otros anticuerpos. En algunas realizaciones, sCD38 y/o fragmentos del mismo se pueden utilizar como un antígeno en ensayos de diagnóstico e investigación mediante biomonitorización. Por ejemplo, en algunas realizaciones, sCD38 y/o fragmentos del mismo se pueden utilizar en ELISA PROMONITOR® para ensayar la biodisponibilidad e inmunogenicidad de fármacos, por ejemplo, de anticuerpos anti-CD38, tal como DARA, isatuximab, o MOR202, en pacientes a los que se ha recetado terapia biológica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas y otras indicaciones (por ejemplo, mieloma múltiple). En algunas realizaciones, el sCD38 se puede utilizar para la familia de ensayos PROMONITOR® para medir tanto los niveles de fármaco como los de anticuerpos anti-fármacos con ELISA validado. En el Apéndice A del presente documento se adjunta un folleto de la familia de pruebas PROMONITOR®.
- 60 60 65 En algunas realizaciones, la eficacia de la mitigación de la interferencia por y/o neutralización de anticuerpos anti-CD38 por el pretratamiento se puede ensayar utilizando una o más técnicas conocidas por un experto en la materia. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pueden utilizar una o más composiciones proporcionadas en el presente documento en DG Gel®, una única tarjeta de gel de 8 columnas basada en la tecnología de aglutinación para la clasificación de grupos sanguíneos y la investigación de anticuerpos inesperados. De este modo, en algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento se pueden utilizar como un reactivo en tarjetas DG Gel® para ensayar la eficiencia de la neutralización de anti-CD38. En algunas realizaciones, la eficacia varía desde aproximadamente >70 % hasta aproximadamente el 100 %. En algunas realizaciones, la eficacia es aproximadamente el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 %, o un valor en un intervalo definido por dos

- valores cualquiera de los mencionados anteriormente. En algunas realizaciones, la eficacia varía desde >90 % hasta el 100 %. En algunas realizaciones, la eficacia es aproximadamente >90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 98,5, 99, 99,5, o el 100 %, o un valor en un intervalo definido por dos valores cualquiera de los mencionados anteriormente.
- 5 En algunas realizaciones, el volumen de una o más composiciones que comprenden sCD38 utilizadas en tarjetas DG Gel® pueden variar desde aproximadamente 0,1 µl hasta aproximadamente 40 µl. En algunas realizaciones, el volumen de las composiciones que comprenden sCD38 utilizadas en tarjetas DG Gel® pueden variar desde aproximadamente 0,4 µl hasta aproximadamente 10 µl. En algunas realizaciones, el volumen de la composición que comprende sCD38 utilizado en tarjetas DG Gel® es aproximadamente 2 µl.
- 10 En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento se pueden utilizar en ensayos para bloquear y/o neutralizar uno o más de DARA, isatuximab, o MOR202 en muestras de sangre, suero, y/o plasma de un paciente.
- 15 En algunas realizaciones, las composiciones, métodos y/o kits proporcionados en el presente documento se pueden utilizar en ensayos para eliminar uno o más anticuerpos anti-CD38 de muestras de sangre, suero y/o plasma de un paciente. Por ejemplo, una muestra de un paciente que comprende anticuerpo anti-CD38 se puede incubar con una composición que comprende sCD38 y/o fragmentos del mismo que comprenden una o más etiquetas divulgadas en el presente documento para permitir que el sCD38 etiquetado y/o fragmentos del mismo se una al anticuerpo anti-CD38. El complejo sCD38-anti-CD38 después puede eliminarse por una o más técnicas de cromatografía de afinidad conocidas por un experto en la materia.
- 20 En algunas realizaciones, un sCD38 etiquetado y/o fragmentos del mismo se pueden utilizar para eliminar anti-CD38 en plasma, suero y/o sangre humanos durante hemodiálisis, diálisis peritoneal, hemofiltración, hemodiafiltración, terapia de recambio plasmático, plasmáferesis, aferesis, y leucorreducción. Por ejemplo, un sCD38 etiquetado y/o fragmentos del mismo se pueden utilizar para eliminar uno o más de DARA, isatuximab, o MOR202 en muestras de sangre, suero y/o plasma de un paciente.
- 25 En algunas realizaciones, un intervalo de concentración del anticuerpo anti-CD38 en una muestra varía desde aproximadamente 0,005 µg/ml hasta aproximadamente 2000 µg/ml. En algunas realizaciones, un intervalo de concentración del anticuerpo anti-CD38 en una muestra varía desde aproximadamente 0,05 µg/ml a aproximadamente 1000 µg/ml. En algunas realizaciones, un intervalo de concentración del anticuerpo anti-CD38 en una muestra varía desde aproximadamente 0,05 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml. En algunas realizaciones, un intervalo de concentración del anticuerpo anti-CD38 en una muestra varía desde aproximadamente 0,05 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml. En algunas realizaciones, un intervalo de concentración del anticuerpo anti-CD38 en una muestra varía desde aproximadamente 0,05 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml. En algunas realizaciones, un intervalo de concentración del anticuerpo anti-CD38 en una muestra es aproximadamente 0,005, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 5, 25, 50, 75, 100, 150, 250, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500 o 2000 µg/ml, o un valor en un intervalo definido por dos valores cualquiera de los mencionados anteriormente. En otras realizaciones, un intervalo de concentración del anticuerpo anti-CD38 en una muestra varía desde aproximadamente 0,05 µg/ml a aproximadamente 2000 µg/ml.
- 30 En algunas realizaciones, el volumen de una o más composiciones que comprenden sCD38 y/o fragmentos del mismo utilizados en los métodos y/o kits divulgados en el presente documento varía desde aproximadamente 0,05 µl hasta aproximadamente 50 µl. En algunas realizaciones, el volumen de una o más composiciones que comprenden sCD38 y/o fragmentos del mismo utilizados en los métodos y/o kits divulgados en el presente documento varía desde aproximadamente 0,25 µl hasta aproximadamente 10 µl. En algunas realizaciones, el volumen de una o más composiciones que comprenden sCD38 utilizado en los métodos y/o kits divulgados en el presente documento es aproximadamente 2 µl.
- 35 En algunas realizaciones, el volumen de una muestra (por ejemplo, sangre, plasma, suero, etc.) puede variar desde aproximadamente 1 µl hasta aproximadamente 100 µl. En algunas realizaciones, el volumen de una muestra (por ejemplo, sangre, plasma, suero, etc.) puede variar desde aproximadamente 100 µl hasta aproximadamente 5 ml. En algunas realizaciones, el volumen de una muestra (por ejemplo, sangre, plasma, suero, etc.) puede variar desde aproximadamente 5 ml hasta aproximadamente 500 ml. En algunas realizaciones, el volumen de una muestra (por ejemplo, sangre, plasma, suero, etc.) puede variar desde aproximadamente 250 ml hasta aproximadamente 10.000 ml. En algunas realizaciones, el volumen de una muestra (por ejemplo, sangre, plasma, suero, etc.) puede variar desde aproximadamente 25 µl hasta aproximadamente 250 µl.
- 40 En algunas realizaciones, la concentración de sCD38 y/o fragmentos del mismo en las composiciones proporcionadas en el presente documento varía desde aproximadamente 0,25 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de sCD38 y/o fragmentos del mismo en las composiciones y composiciones en kits de las mismas proporcionadas en el presente documento varía desde aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de sCD38 y/o fragmentos del mismo en las gamas de composiciones proporcionadas en el presente documento es aproximadamente 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375 o 400 mg/ml, o un valor en un intervalo definido por dos valores cualquiera de los mencionados anteriormente. En algunas
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

realizaciones, la concentración de sCD38 y/o fragmentos del mismo en las composiciones proporcionadas en el presente documento es aproximadamente 20 mg/ml.

- 5 En algunas realizaciones, un intervalo de concentración de sCD38 y/o fragmentos del mismo para la inhibición óptima de anti-CD38 varía desde aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. En algunas realizaciones, un intervalo de concentración de sCD38 y/o fragmentos del mismo para la inhibición óptima de anti-CD38 varía desde aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml.
- 10 En algunas realizaciones, la estabilidad de las realizaciones de sCD38 y/o fragmentos del mismo según la presente divulgación varía desde aproximadamente 30 días a aproximadamente 300 días a 37 °C. En algunas realizaciones, la estabilidad de sCD38 y/o fragmentos del mismo varía desde aproximadamente 6 meses a aproximadamente 48 meses a 2 hasta 8 °C.
- 15 En algunas realizaciones, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden proporcionarse en forma de uno o más kits.
- 20 En algunas realizaciones, las composiciones y composiciones en kits de las mismas se proporcionan en forma líquida, sólida o semisólida. Entre los ejemplos no limitantes se incluyen cápsula, comprimido, óvulo, inserto, oblea, gránulo, pella, perla, píldora, sobrecitos, comprimidos dispersables, película, crema, gel jarabe, sólido reconstituyible, suspensión, emulsión, pastilla, polvo, triturado, plaqueta, etc.
- 25 En algunas realizaciones, las composiciones y composiciones en kits de las mismas comprenden ingredientes activos, ingredientes inactivos, excipientes, aditivos, y/o soportes farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos no limitantes incluyen compuestos poliméricos, sales inorgánicas, aminoácidos (los ejemplos no limitantes incluyen arginina, histidina, prolina etc.), aglutinantes, lubricantes, disgregantes, tensioactivos, espesantes, agentes de recubrimiento, agentes de ajuste de pH, antioxidantes, agentes saborizantes, conservantes, colorantes, etc. Los ejemplos no limitantes de otros soportes farmacéuticamente aceptables incluyen soportes líquidos, tales como agua, alcohol, emulsión, y soportes sólidos, tales como gel, polvo, etc. En algunas realizaciones, las composiciones y composiciones en kits de las mismas pueden comprender sales adecuadas y tampones para dar vehículos de administración estables y permitir la absorción por células diana.
- 30 En algunas realizaciones, los soportes farmacéuticamente aceptables pueden incluir uno o más disolventes, tampones, soluciones, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, quelantes de metales (por ejemplo, EDTA), agentes isotónicos y de retardo de absorción, y similares.
- 35 En algunas realizaciones, las composiciones acuosas y composiciones en kits de las mismas comprenden una cantidad eficaz de sCD38 y/o un fragmento del mismo (por ejemplo, como proteína, ácido nucleico, o ambos) en un vehículo de administración (por ejemplo, liposomas, nanopartículas, u otros complejos), disueltos o dispersados en un soporte farmacéuticamente aceptable o medio acuoso. Otros excipientes incluyen polímero soluble en agua, polímeros insolubles en agua, materiales hidrofóbicos, materiales hidrofilicos, ceras, disgregantes, superdisgregantes, diluyentes, aglutinantes, etc.
- 40 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier vertebrado, que incluye, sin limitación, humanos, primates no humanos, ganado, oveja, cerdos, cabras, caballos, perros, gatos, ratones, ratas, conejillos de Indias, pollo, pavo, patos, gansos. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un hombre o una mujer.
- Etiqueta de oligomerización para proteínas de fusión
- 45 50 La presente divulgación también se refiere a proteínas de fusión que comprenden una etiqueta de oligomerización y a métodos para la oligomerización de una proteína de fusión recombinante. La presente divulgación también se refiere a etiquetas de oligomerización para proteínas de fusión recombinantes que comprenden una región Fc de inmunoglobulina o un fragmento de la misma y un dominio poli-His.
- 55 La presente invención proporciona una etiqueta de oligomerización para una proteína de fusión recombinante, la etiqueta de oligomerización comprende una región Fc de inmunoglobulina o un fragmento de la misma y un dominio poli-His, en donde el dominio poli-His contiene 8, 9, 10, 11 o 12 reisudos de histidina.
- 60 Las proteínas de fusión pueden fusionarse opcionalmente a una etiqueta de oligomerización para la formación de oligómeros, tales como dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, y/o oligómeros de orden superior. Una etiqueta de oligomerización puede favorecer una estequiometría específica, por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros, o pentámeros, o una etiqueta de oligomerización puede permitir una distribución de oligómeros que tienen diferentes estequiometrías. Una etiqueta de oligomerización puede estar diseñada para formar homooligómeros, aunque la distinción entre homooligómeros y heterooligómeros no es particularmente limitante. En algunas realizaciones, la etiqueta de oligomerización es capaz de formar un homodímero, homotrímero, homotetrámero, u homopentámero, por ejemplo, en donde la oligomerización de un polipéptido recombinante produce un oligómero predominantemente
- 65

- monodisperso. Una etiqueta de oligomerización proporciona diversas ventajas para las proteínas de fusión que se utilizan en los ensayos. Una etiqueta de oligomerización puede orientar los polipéptidos recombinantes relativos entre sí. Una etiqueta de oligomerización puede también aumentar la afinidad de un polipéptido recombinante por una diana. Una etiqueta de oligomerización también puede aumentar la avidez de un polipéptido recombinante que se refiere a la acumulación funcional de afinidad con múltiples grupos de unión.
- La proteína de fusión comprende un polipéptido recombinante fusionado a una etiqueta de oligomerización de la invención. En algunas realizaciones, la secuencia del polipéptido recombinante y/o el fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 25, y SEQ ID NO: 26. La etiqueta de oligomerización comprende una región Fc de inmunoglobulina o un fragmento de la misma y un dominio poli-His. En algunas realizaciones, la secuencia de la proteína de fusión y/o el fragmento de la misma se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, y SEQ ID NO: 21.
- En algunas realizaciones el dominio poli-His es un dominio de purificación fusionado a una proteína recombinante. En algunas realizaciones el dominio poli-His es una etiqueta de afinidad fusionada a una proteína recombinante. En algunas realizaciones, el dominio poli-His es una etiqueta de oligomerización fusionada a una proteína recombinante. En algunas realizaciones, el dominio poli-His está comprendido dentro de una etiqueta de oligomerización junto con una región Fc de inmunoglobulina o un fragmento de la misma.
- Un dominio poli-His según las realizaciones en el presente documento, contiene 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de histidina.
- La proteína de fusión en el presente documento se expresa fusionada a una etiqueta de oligomerización que comprende una región Fc de inmunoglobulina o un fragmento de la misma y un dominio poli-His, en donde el dominio poli-His contiene 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de histidina. En algunas realizaciones la etiqueta de oligomerización incluye la secuencia de aminoácidos de una región bisagra del dominio Fc de inmunoglobulina.
- En algunas realizaciones, la etiqueta de oligomerización comprende una región constante de inmunoglobulina IgG1. En algunas realizaciones, la etiqueta de oligomerización comprende una región constante de inmunoglobulina IgG2. En algunas realizaciones, la etiqueta de oligomerización comprende una región constante de inmunoglobulina IgG3. En algunas realizaciones, la etiqueta de oligomerización comprende una región constante de inmunoglobulina IgG4. En algunas realizaciones, la etiqueta de oligomerización comprende un fragmento de una inmunoglobulina de cualquiera de los isotipos de IgG anteriores de la región constante con una región bisagra alterada de tal modo que se expresa una fusión de Fc monomérica. En algunas realizaciones, la etiqueta de oligomerización comprende un fragmento de una región constante de inmunoglobulina IgG que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, que está fusionado en el extremo C-terminal a un dominio poli-His y a un codón de terminación.
- Las especies de un dominio Fc de inmunoglobulina pueden seleccionarse en base a la utilización deseada de una proteína de fusión. Por ejemplo, las especies de dominio Fc de inmunoglobulina pueden seleccionarse de tal modo que un reactivo específico se dirige a o ignora el dominio Fc de inmunoglobulina en un ensayo. Un dominio Fc de ratón puede ser útil, por ejemplo, si no se utiliza ningún anticuerpo secundario anti-ratón para detectar otros anticuerpos de ratón en un ensayo. De forma similar, un dominio Fc puede ser útil para entrecruzar una proteína de fusión a un soporte sólido u otro componente de un ensayo, utilizando un anticuerpo anti-ratón. Las especies de dominio Fc pueden ser humano, ratón, conejo, rata, hámster, conejillo de Indias, cabra, oveja, caballo, pollo, o una quimera de cualquiera de las especies anteriores, aunque la especie del dominio Fc no es particularmente limitante.
- Una etiqueta de oligomerización ejemplar es el dominio Fc de IgG de ratón que comprende la región bisagra, que permite a los polipéptidos recombinantes que comprenden la etiqueta de oligomerización formar un homodímero covalente.
- En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la región Fc de la etiqueta de oligomerización es SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina tiene, al menos, un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina tiene entre un 90 % y un 100 % de identidad con SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina tiene, al menos, un 90 %, al menos, un 95 % o, al menos, un 98 % de identidad con SEQ ID NO: 15.
- Además de los beneficios de las etiquetas de oligomerización descritos anteriormente, los dominios Fc a menudo aumentan la expresión y/o secreción de un polipéptido recombinante en células de expresión.
- Los dominios Fc también pueden ayudar a la purificación de un polipéptido recombinante, dado que los métodos de purificación de polipéptidos que comprenden los dominios Fc son bien conocidos en la técnica.
- En algunas realizaciones, la proteína de fusión en el presente documento comprende un polipéptido recombinante y/o un fragmento del mismo fusionado a una etiqueta de oligomerización según la presente invención. En algunas realizaciones, el polipéptido recombinante es una forma soluble recombinante de un dominio extracelular de CD38 o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el polipéptido recombinante es un dominio extracelular

modificado de CD47 o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el polipéptido recombinante es un dominio extracelular modificado de la glucoproteína de plaquetas Iba (Gplba) o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, la secuencia del polipéptido recombinante y/o el fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 25, y SEQ ID NO: 26.

5 En algunas realizaciones, la secuencia de la etiqueta de oligomerización se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

10 En algunas realizaciones, la etiqueta de oligomerización además comprende una región o dominio con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, y SEQ ID NO: 30.

15 La presente divulgación también se refiere a métodos para la oligomerización de una proteína de fusión recombinante. Los métodos para la oligomerización de una proteína de fusión recombinante comprenden las etapas de: a) fusionar genéticamente una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta de oligomerización según las realizaciones de la presente invención a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido; b) expresar la secuencia de nucleótidos resultante de la etapa a) en una célula huésped; c) purificar la proteína de fusión recombinante obtenida en la etapa b).

20 La etiqueta de oligomerización usada en el método para la oligomerización de una proteína de fusión recombinante comprende una región Fc de inmunoglobulina o un fragmento de la misma y un dominio poli-His. Un dominio poli-His según realizaciones en el presente documento contiene 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de histidina. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la región Fc de la etiqueta de oligomerización usada en el método para la oligomerización de una proteína de fusión recombinante es SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina tiene, al menos, un 90 % de identidad con SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina tiene entre un 90 % y un 100 % de identidad con SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina tiene, al menos, un 90 %, al menos, un 95 % o, al menos, un 98 % de identidad con SEQ ID NO: 15.

25 30 En algunas realizaciones, la secuencia de la etiqueta de oligomerización usada en el método para la oligomerización de una proteína de fusión recombinante se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

35 En algunas realizaciones, la etiqueta de oligomerización usada en el método para la oligomerización de una proteína de fusión recombinante además comprende una región o dominio con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, y SEQ ID NO: 30.

40 45 En algunas realizaciones, la secuencia de la proteína de fusión recombinante obtenida en la etapa c) del método para la oligomerización de una proteína de fusión recombinante divulgada en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son no limitantes y en el ámbito de la presente divulgación se incluyen otras variantes contempladas por un experto en la materia.

Ejemplo 1

50 Se construyeron múltiples versiones de la proteína CD38 para intentar recrear el plegamiento correcto de CD38ecd y para impedir que un Acm terapéutico cause problemas en un ensayo de detección de anticuerpos irregulares. Una versión era un dominio extracelular monomérico fusionado a una etiqueta de afinidad (CD38ecd-10His). En una segunda versión, fusión CD38ecd-Fc, el CD38ecd se fusionó a una región Fc murina (bisagra-CH2-CH3) lo cual crea, de este modo, versiones dímericas (doblete) unidas por la región Fc. En otra versión, la fusión CD38ecd-Fc-10H, el CD38ecd se fusionó a una etiqueta de oligomerización, lo cual crea, de este modo versiones multiméricas. En otra versión, CD38ecd-Clath, el CD38ecd se fusionó a un dominio de clatrina. El dominio de clatrina permitió la trimerización. Otra versión, CD38ecd-p53, implicó la fusión a un dominio p53. Se sabe que el dominio p53 provoca tetramerización. En todos los casos estas son composiciones nuevas que no se encuentran en la naturaleza. Las versiones se expresaron en células de mamífero a efectos de mantener cualquier modificación posttraduccional esencial para el mantenimiento de la función de CD38.

Ejemplo 2

Varias empresas venden una proteína CD38 recombinante para su utilización en investigación. Sin embargo, la cantidad y el coste de CD38 comercialmente disponible es prohibitivo para muchos objetivos. Los intentos de otras compañías para producir CD38 recombinante han estado cargados de dificultades, tales como problemas de solubilidad, de obtención de una concentración elevada, y avidez del epitopo a través del soporte y ninguna de las proteínas CD38 comercialmente disponibles tiene la composición de las proteínas CD38 y/o fragmentos de las mismas, tal como proporcionan en el presente documento.

5 10 Los ensayos iniciales con los sistemas de expresión que se describen en el presente documento muestran que CD38ecd-Fc-10H era soluble y funcional. De manera importante, el CD38ecd-Fc-10H recombinante era soluble a concentraciones elevadas (hasta 35 mg/ml) permitiendo la utilización de tan solo 2 µl de la solución concentrada de CD38ecd Fc en tarjetas DG Gel®.

15 Ejemplo 3 – Titulaciones de anti-CD38 en muestras de pacientes

El objetivo de este experimento era establecer la cantidad mínima de la proteína CD38ecd-Fc-10H requerida para inhibir y neutralizar completamente en términos generales el anticuerpo anti-CD38 de concentración y titulación desconocidas que se encuentra en muestras de plasma de pacientes, a efectos de eliminar completamente el efecto del anticuerpo anti-CD38. Se tituló el plasma de tres pacientes después del tratamiento con anti-CD38 en una prueba indirecta de antiglobulina (IAT) con un reactivo de eritrocitos para el cribado de anticuerpos comercial. El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera:

25 Titulación del plasma: Se titularon aritméticamente 75 µl de plasma que contenía anti-CD38 de cada paciente en PBS, pH 7,4 hasta 1:8192.

30 Cribado de anticuerpos: Se pipetaron 50 µl de una célula de Screen-Cyte 0,8 % (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Suiza) y 25 µl del título de plasma respectivo en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta de DG Gel Coombs (Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó después en una centrífuga para tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados.

Los títulos establecidos oscilaron entre 1:1 y 1:4096. Se concluyó que para un pretratamiento eficaz del plasma de paciente con sCD38, se tenía que neutralizar un título de anti-CD38 de, al menos, 1:2048, mejor 1:8192.

35 Ejemplo 4 - sCD38 inhibe anticuerpos anti-CD38

Ejemplo 4a: Inhibición utilizando una preparación que contiene CD38ecd-Fc-10H 2,2mg/ml

40 Preparación de las muestras (ensayo de inhibición): Se incubaron 25 µl de plasma del paciente 1 que contenía anti-CD38, no diluido o titulado aritméticamente en PBS, pH 7,4, con de 2 µl hasta 32 µl de una preparación que contenía CD38ecd-Fc-10H 2,2 mg/ml y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Como experimento control, de 2 µl a 32 µl de PBS, pH 7,4, se pipetaron en el plasma en lugar de CD38ecd-Fc-10H.

45 Cribado de anticuerpos: Se pipetaron 50 µl de Screen-Cyte 0,8 % Célula #3, lote 17005 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Suiza) y 25 µl del plasma pretratado, tal como se describe anteriormente, en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta DG Gel Coombs (lote 17612.01 exp 2018-02; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó después en una centrífuga para tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados. Un resultado completamente negativo (un botón plano de células en la parte inferior de la microcolumna) era indicativo de una inhibición completa del anti-CD38 presente en la muestra del paciente.

50 Con 2 µl de CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAEPCPBS, una dilución 1:16 del plasma pudo inhibirse completamente. Con 32 µl de CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAEPCPBS 2,2 mg/ml, el anti-CD38 en plasma no diluido pudo inhibirse completamente.

55 Ejemplo 4b: Inhibición utilizando una preparación que contiene CD38ecd-Fc-10H 35mg/ml

60 Preparación de las muestras (ensayo de inhibición): Se incubaron 25 µl de plasma del paciente 2 que contenía anti-CD38 (que muestra un título de anti-CD38 de 1:4096) con 2 µl de CD38ecd-Fc-10H 35 mg/ml y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Como experimento control, se pipetaron 2 µl de PBS, pH 7,4 en el plasma en lugar de CD38ecd-Fc-10H.

65 Cribado de anticuerpos: Se pipetaron 50 µl de cada célula de Screen-Cyte 0,8 %, lote 17017 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Suiza) y 25 µl del plasma pretratado, tal como se describe anteriormente, en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta DG Gel Coombs (lote 16681.01 exp 2017-11; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó después en una centrífuga para

tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados. Un resultado completamente negativo (un botón plano de células en la parte inferior de la microcolumna) era indicativo de una inhibición completa del anti-CD38 presente en la muestra del paciente.

5 Con 2 µl de CD38ecd- Fc10H-20170915-PROTA, pudo inhibirse completamente el plasma del paciente 2.

Ejemplo 4c: Inhibición de plasma de paciente de DARA simulado (0,5mg/ml) utilizando una preparación que contiene CD38ecd-Fc-10H 33mg/ml

10 Generación de plasma de paciente simulado con DARA añadido: Se añadió el fármaco terapéutico anti-CD38 (Darzalex) a plasma AB humano a una concentración final de 0,5 mg/ml.

15 Preparación de las muestras (ensayo de inhibición): Se incubaron 25 µl de plasma de paciente simulado de DARA con 2 µl de CD38ecd-Fc-10H 33 mg/ml y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Como experimento control, se pipetaron 2 µl de PBS, pH 7,4 en el plasma en lugar de CD38ecd-Fc-10H.

20 Cribado de anticuerpos: Se pipetaron 50 µl de cada célula de Screen-Cyte 0,8 %, lote 180005 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Suiza) y 25 µl del plasma simulado pretratado, tal como se describe anteriormente, en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta DG Gel Coombs (lote 17133.01 exp 2018-10; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó después en una centrífuga para tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados. Un resultado completamente negativo (un botón plano de células en la parte inferior de la microcolumna) era indicativo de una inhibición completa del anti-CD38 presente en la muestra del paciente.

25 Con 2 µl de CD38ecd-FC10H-GDS20171106 pudo inhibirse completamente el plasma del donante con DARA añadido 0,5 mg/ml.

Ejemplo 5 – La inhibición de anti-CD38 por CD38ecd-Fc-10H es específica y no interfiere con aloanticuerpos de grupo sanguíneo relevantes subyacentes

30 Ejemplo 5a: Detección de un título bajo de anti-D en plasma de DARA simulado después del pretratamiento con CD38ecd-Fc-10H2,2mg/ml

35 Se añadió anti-D policlonal humano a un plasma simulado de un paciente en tratamiento con Darzalex el cual se volvió detectable por un panel de cribado comercial sólo después del pretratamiento con sCD38. En el plasma simulado con anti-D añadido pretratado con PBS fue imposible detectar correctamente el anti-D dado que el Darzalex interfirió con el método de cribado de anticuerpos, produciendo de este modo reacciones positivas en todas las células del cribado de anticuerpos derivado de la reacción de células de cribado con Darzalex.

40 (1) Experimentos de titulación de fármacos: Se utilizó el fármaco terapéutico anti-CD38 (Darzalex; lote GHS0901, Janssen, Estados Unidos) para preparar un plasma de paciente simulado tras la dilución en plasma AB humano en donde un anticuerpo policlonal anti-D humano se añadió al plasma AB humano. Se titularon aritméticamente 75 µl de fármaco terapéutico anti-CD38 (Darzalex) en plasma AB humano para generar plasma de paciente simulado. Se pipetaron 50 µl de Screen-Cyte 0,8 % Célula #3, lote 17005 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Suiza) y 25 µl de cada título de Darzalex en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta DG Gel Coombs (lote 17612.01 exp 2018-02; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó después en una centrífuga para tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados. Este experimento estableció el título de anti-CD38 contenido en Darzalex como 1:64.000.

50 (2) Titulación anti-D: Se tituló aritméticamente suero de donante con título elevado de anti-D en plasma AB humano. Se pipetaron 50 µl de Screen-Cyte 0,8 % Célula #1, lote 17005 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Suiza) y 25 µl de cada título de anti-D en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta DG Gel Coombs (lote 17612.01 exp 2018-02; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó en una centrífuga para tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados. Este experimento estableció el título de anti-D en el suero del donante como 1:16.000 con la célula 1.

60 (3) Plasma de paciente simulado: Se añadió una dilución 1:512 de anti-D en plasma AB humano previamente diluido con diluciones 1:16.000 y 1:8.000 de Darzalex a efectos de conseguir un plasma simulado con una concentración de anti-CD38 que se pudiera inhibir con 2 µl de CD38ecd-Fc-10H 2,2 mg/ml y tuviera un valor de anti-D cercano al límite de detección. El plasma simulado con anti-D añadido reaccionó positivamente con las 3 células en el cribado de anticuerpos llevado a cabo, tal como se presenta después, en el punto (5). Adicionalmente, se añadió una dilución anti-D 1:4.000 a 100 µl de plasma del paciente 2 (TF1707/527) que contenía anti-CD38.

65 (4) Preparación de las muestras (ensayo de inhibición): Se incubaron 25 µl de plasma simulado con anti-D añadido, preparado tal como se describe en los puntos (1) a (3) anteriores, respectivamente con 2 µl o 32 µl de CD38ecd-Fc-

10H 2,2 mg/ml (CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAEP PBS) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Como experimento control, se pipetearon 2 µl o 32 µl de PBS, pH 7,4 en el plasma, en lugar de CD38ecd-Fc-10H.

5 (5) Cribado de anticuerpos: Se pipetearon 50 µl de Screen-Cyte 0,8 % Células #1-3, lote 17005 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Suiza) y 25 µl of the plasma pretratado, tal como se describe anteriormente, en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta DG Gel Coombs (lote 17612.01 exp 2018-02; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó después en una centrifuga para tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados. Un resultado completamente negativo (un botón plano de células en la parte inferior de la microcolumna) era indicativo de una inhibición completa del anti-CD38 presente en la muestra del paciente.

10 Con 2 µl de CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAEP PBS 2,2 mg/ml el plasma simulado con anti-D añadido pudo inhibirse completamente en la célula #3, negativa para D, del panel de cribado de anticuerpos. Con 32 µl de CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAEP PBS, el plasma del paciente 2 con anti-D añadido pudo inhibirse completamente en la célula #3, negativa para Darzalex, del panel de cribado de anticuerpos (Fig. 13). Las células 1 y 2 permanecieron positivas después de la inhibición, indicando que el ensayo de inhibición llevado a cabo como en (4) no tiene impacto en la reactividad del anticuerpo anti-D adicionado. Los experimentos control con plasma simulado sin anti-D añadido (inhibición completa de células #1-3 y con plasma con anti-D añadido utilizando PBS en lugar de CD38ecd-Fc-10H (sin inhibición) mostraron los resultados esperados (Fig. 13).

15 Ejemplo 5b: La inhibición de anti-CD38 por CD38ecd-Fc-10H permite la detección de anticuerpos inesperados relevantes en plasma de donante con anti-CD38 añadido

20 Se utilizó plasma de donante con anti-CD38 añadido que contenía anticuerpos inesperados para evaluar la detección de anticuerpos inesperados después de la inhibición completa de anti-CD38 por CD38ecd-Fc-10H. Anti-D, anti-E, anti-c, anti-Cw, anti-K, anti-Fya, anti-Jka, anti-S, anti-s, anti-M, anti-Lua, anti-Cob se volvieron detectables por un panel de cribado comercial sólo después del pretratamiento con CD38ecd-Fc-10H.

25 (1) Generación de plasma de paciente simulado: plasma AB de donante con anti-CD38 y aloanticuerpos añadidos:
30 El fármaco terapéutico anti-CD38 (Darzalex) se añadió al plasma AB humano a una concentración final de 0,5mg/ml. Cada aloanticuerpo enumerado anteriormente se tituló aritméticamente en plasma AB humano: 50 µl de Screen-Cyte 0,8 % (para cada anticuerpo se seleccionó una célula del panel positivo para el correspondiente antígeno en base a una matriz de antígeno de producto), y 25 µl de cada dilución de aloanticuerpo analizado se pipetearon en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta DG Gel Coombs (lote 17133.01 exp 2018-10; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó después en una centrifuga para tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados. La última dilución que dio una reacción positiva apenas detectable se utilizó como dilución para la adición de anticuerpo inesperado en plasma de donante con anti-CD38 añadido.

35 (2) Preparación de las muestras (ensayo de inhibición): Se mezclaron 25 µl de plasma de donante con anti-CD38 añadido que contenía anticuerpos inesperados con 2 µl de CD38ecd-Fc-10H 33,4mg/ml y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C.

40 (3) Cribado de anticuerpos: Se pipetearon 50 µl de Screen-Cyte 0,8 % Células #1-3, lote 17026 o 18003 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Suiza) y 25 µl de plasma simulado pretratado en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta DG Gel Coombs (lote 17133.01 exp 2018-10; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó después en una centrifuga para tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados.

45 Una proporción de 2µl de CD38ecd-Fc-10H (33,4mg/ml) por 25µl de plasma permitió la detección de 16/16 anticuerpos subyacentes añadidos en cantidades apenas detectables en plasma de donante con DARA añadido (Fig. 14, tabla 2). Las especificidades de anticuerpo incluían anti-D, anti-E, anti-c, anti-Cw, anti-K, anti-Fya, anti-Jka, anti-S, anti-s, anti-M, anti-Lua, anti-Cob.

Tabla 2. Detección de anticuerpos subyacentes en plasma de donante con DARA añadido

Especificidad	Preincubacion con 2µl de CD38ecd-Fc-10H		
	-	-	1
K	-	-	1+
K	-	-	-
D	1	1	-
D	+/-	1	-
E	-	2	-
E	-	1	-
Fya	-	-	1
Fya	-	-	1
Jka	1	-	1-
S	-	+/-	-
S	-	-	1-
c	-	1-	1-
Cob Fya	2-	1-	2
Lua	-	+/-	-
Cw	1-	-	-
M	-	-	+/-
	Célula #1	Célula #2	Célula #3

Ejemplo 6 – Proyección de la estabilidad de CD38ecd-Fc-10H (Estabilidad acelerada)

5 Ejemplo 6a: Inhibición completa de plasma anti-CD-38 no diluido

Se tomaron cinco alícuotas de 100 µl de una preparación de CD38ecd-Fc-10H, CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAEPCPBS, en tubos separados cerrados con tapones de rosca y se colocaron en un incubador a temperatura constante de 37 °C. Antes de empezar la incubación (es decir, el día 0) y los días 7, 14, 21, y 31, un tubo se transfirió a 2-8 °C hasta el día 31. El día 31 se analizaron todas las alícuotas según el siguiente método:

10 Preparación de las muestras (ensayo de inhibición): Se incubaron 25 µl de plasma del paciente 1 (TF1715-197) no diluido que contenía anti-CD38 con 32 µl de CD38ecd-Fc-10H y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Como experimento control, se pipetearon 32 µl de PBS, pH 7,4 en el plasma, en lugar de CD38ecd-Fc-10H. De forma alternativa, se incubó plasma solo durante 15 minutos a 37 °C.

15 Cribado de anticuerpos: Se pipetearon 50 µl de una dilución al 1 % de eritrocitos de grupo sanguíneo O en DG Gel Sol (lote 16015 exp 2018-04; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y 25 µl de plasma pretratado, tal como se describe anteriormente, en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta DG Gel Coombs (lote 20 1e7612.01 exp 2018-02; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó después en una centrífuga para tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados. Un resultado completamente negativo (un botón plano de células en la parte inferior de la microcolumna) era indicativo de una inhibición completa del anti-CD38 presente en la muestra del paciente. Los resultados de los días 0, 7, 14, 21, y 31 mostraron igualmente inhibición completa, mientras que el experimento control mostró una puntuación de reacción de 2, es decir, sin inhibición. En base a un diagrama de Arrhenius, se puede convertir la estabilidad demostrada del CD38ecd-Fc-10H de 31 días a 37 °C en estabilidad de, al menos, 24 meses, cuando se almacena a 25 2 hasta 8 °C.

25 Ejemplo 6b: Inhibición de plasma anti-CD38 titulado por 2 µl de CD38ecd-Fc-10H 2,2 mg/ml

30 Se tomaron cinco alícuotas de 100 µl de una preparación de CD38ecd-Fc-10H, CD38ecd-Fc10H-20170313-NTAEPCPBS, en tubos separados cerrados con tapones de rosca y se colocaron en un incubador a una temperatura constante de 37 °C. Antes de empezar la incubación y los días 7, 14, 21, 31, un tubo se transfirió a 2-8 °C hasta el día 31. El día 31 se analizaron todas las alícuotas según el siguiente método: 200 µl de plasma del paciente 1 (TF1715-197) que contiene anti-CD38 se tituló aritméticamente en PBS, pH 7,4 (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) después de que se estableciera en experimentos preliminares que 25 µl of plasma diluido 1:8 podría inhibirse totalmente con un volumen de 2 µl de CD38ecd-Fc-10H.

35 Preparación de las muestras (ensayo de inhibición): Se incubaron 25 µl de la respectiva titulación de plasma del paciente 1 (TF1715-197) que contiene anti-CD38 con 2 µl de CD38ecd-Fc-10H 2,2 mg/ml y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Como experimento control, se pipetearon 2 µl PBS, pH 7,4 en el plasma, en lugar de CD38ecd-Fc-10H.

Cribado de anticuerpos: Se pipetaron 50 µl de una dilución al 1 % de eritrocitos del grupo sanguíneo O en DG Gel Sol (lote 16015 exp 2018-04; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y 25 µl del plasma pretratado, tal como se describe anteriormente, en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta DG Gel Coombs (lote 17612.01 exp 2018-02; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó después en una centrífuga para tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados. Un resultado completamente negativo (un botón plano de células en la parte inferior de la microcolumna) era indicativo de una inhibición completa del anti-CD38 presente en la muestra del paciente. Los resultados de los días 0, 7, 14, 21, y 31 mostraron igualmente inhibición completa a un título de 1:8, mientras que el control mostró una puntuación de la reacción de 2, es decir, sin inhibición, durante toda la titulación. En base al diagrama de Arrhenius, la estabilidad demostrada del CD38ecd-Fc-10H de 31 días a 37 °C se puede convertir a estabilidad de, al menos, 24 meses, cuando se almacena a 2 hasta 8 °C.

Ejemplo 7 – Comparación de funcionalidad de CD38ecd-Fc-10H frente a CD38 recombinante humano (rhCD38)

Generación de plasma de paciente simulado con DARA añadido: el fármaco terapéutico anti-CD38 (Darzalex) se añadió al plasma AB humano a una concentración final de 0,5mg/ml.

Preparación de las muestras (ensayo de inhibición): Se mezclaron 25 µl de plasma de donante con anti-CD38 añadido con 2 µl de CD38ecd-Fc10H 33,4mg/ml o con 0,447mg/ml de rhCD38 (CD38-6H, R&D Systems, cat #2404-AC-010, lote PEH0417081, Minneapolis, Estados Unidos) o con PBS, pH 7,4 y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C.

Cribado de anticuerpos: Se pipetaron 50 µl de Screen-Cyte 0,8 % Células #1-3, lote 18001 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Suiza) y 25 µl del plasma simulado pretratado en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta DG Gel Coombs (lote 17108.01 exp 2018-09; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó después en una centrífuga para tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados. Un resultado completamente negativo (un botón plano de células en la parte inferior de la microcolumna) era indicativo de una inhibición completa del anti-CD38 presente en la muestra del paciente.

2µl de CD38ecd recombinante-Fc10H permitieron la inhibición completa de anti-CD38 0,5mg/ml. Por el contrario, el rhCD38 comercial utilizado en las mismas condiciones experimentales no pudo inhibir la misma concentración de anti-CD38 (Fig. 15).

Ejemplo 8 – Comparación de tiempos de incubación y temperaturas de incubación para la inhibición de anti-CD38 por CD38ecd-Fc10H

Preparación de las muestras (ensayo de inhibición): El fármaco terapéutico anti-CD38 (Darzalex; lote GHS0901, Janssen, Estados Unidos) se diluyó en PBS pH 7,4 a una concentración final de 2 mg/ml. Se titularon aritméticamente 150 µl de esta solución en PBS, pH 7,4 hasta 1:8. Se mezclaron 25 µl de cada dilución de anti-CD38 con 2 µl de CD38ecd-Fc10H 33,4 mg/ml, y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C, 15 minutos a temperatura ambiente, o 30 minutos a temperatura ambiente.

Cribado de anticuerpos: Se pipetaron 50 µl de Screen-Cyte 0,8 % Células #3, lote 17025 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Suiza) y 25 µl de la muestra tratada anteriormente en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta DG Gel Coombs (lote 17108.01 exp 2018-09; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó después en una centrífuga para tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados. Un resultado completamente negativo (un botón plano de células en la parte inferior de la microcolumna) era indicativo de una inhibición completa del anti-CD38 presente en la muestra del paciente.

Con 2 µl de CD38ecd-Fc10H, una dilución 1:4 de la muestra (correspondiente a anti-CD38 0,5mg/ml) pudo inhibirse completamente en los tres pretratamientos (Fig. 16).

Ejemplo 9 – Comparación de la actividad de CD38ecd-Fc-10H frente a CD38ecd-flex-Fc-10H y a CD38ecd-10H

Preparación de las muestras (ensayo de inhibición): El fármaco terapéutico anti-CD38 (Darzalex; lote GHS0901, Janssen, Estados Unidos) se diluyó en PBS pH 7,4 a una concentración final de 1 mg/ml. Se titularon aritméticamente 150 µl de esta solución en PBS, pH 7,4 hasta 1:8. Se mezclaron 25 µl de cada dilución anti-CD38 con 2 µl CD38ecd-Fc-10H ~8,5 mg/ml, o CD38ecd-flex-Fc-10H ~8,5mg/ml, o CD38ecd-10H ~5mg/ml y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C.

Cribado de anticuerpos: Se pipetaron 50 µl de Screen-Cyte 0,8 % Células #3, lote 18009 (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Suiza) y 25 µl de la muestra pretratada anteriormente en la cámara de incubación de una microcolumna en una tarjeta DG Gel Coombs (lote 17133.01 exp 2018-10; Diagnostic Grifols, Barcelona, España) y

se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. La tarjeta se centrifugó después en una centrífuga para tarjetas DG Gel y se realizó la lectura de los resultados. Un resultado completamente negativo (un botón plano de células en la parte inferior de la microcolumna) era indicativo de una inhibición completa del anti-CD38 presente en la muestra del paciente.

5 Con 2 μ l de CD38ecd-Fc-10H y con 2 μ l de CD38ecd-flex-Fc-10H, una dilución 1:8 de la muestra (correspondiente a anti-CD38 0,125mg/ml) pudo inhibirse completamente. Con 2 μ l de CD38ecd-10H una dilución 1:8 de la muestra no pudo inhibirse completamente. Solo una dilución 1:128 de la muestra (correspondiente a anti-CD38 0,008mg/ml) pudo inhibirse completamente con 2 μ l de CD38ecd-10H (Fig. 17).

10 Ejemplo 10 – Oligomerización de proteínas de fusión Fc-poli-His

15 Tres proteínas de interés, CD38ecd, CD47ecd1 y Gp1ba, se fusionaron de forma recombinante a diferentes versiones de la etiqueta de oligomerización Fc-poli-His a efectos de investigar la capacidad de formar oligómeros de las proteínas de fusión recombinantes resultantes.

20 Una versión fue la proteína recombinante sCD38 fusionada a la etiqueta Fc-10His. Esta proteína se expresó y purificó hasta 50mg/ml sin la detección de agregación visible. En una segunda versión, la proteína recombinante sCD38 se fusionó a la etiqueta flex-Fc-10His. En esta versión de la proteína de fusión la región bisagra de Fc se sustituyó por un enlazador flexible sin cisteínas. En una tercera versión, la proteína recombinante sCD38 se fusionó a una región Fc. En una cuarta versión, la proteína recombinante sCD38 se fusionó a la etiqueta 10His.

25 Con el objetivo de aplicar el método para la oligomerización de proteínas de fusión a otras proteínas de interés, la etiqueta de oligomerización Fc-10His se fusionó a la proteína CD47ecd1 en una versión de esta proteína. Una versión diferente de la etiqueta de oligomerización también se fusionó a la proteína Gp1ba. En una primera versión la proteína recombinante Gp1ba se fusionó a una etiqueta Fc-8His. En una segunda versión, la proteína recombinante Gp1ba se fusionó a una etiqueta 6His. En una tercera versión la proteína recombinante Gp1ba se fusionó a una etiqueta p53-6His. En una cuarta versión la proteína recombinante Gp1ba se fusionó a una etiqueta

30 Las múltiples versiones de proteínas de fusión se expresaron y purificaron en un sistema de expresión eucariota. Mediante cromatografía de exclusión molecular mediante dispersión dinámica de luz (SEC-MALS/DLS) se midió la masa (Mw), el radio hidrodinámico (Rh(w)) y la polidispersidad (Mw/Mn) de las proteínas en solución (tabla 3). Se calculó el grado de oligomerización a partir de la proporción entre la masa medida (Mw) y la masa teórica (Th.Mw).

35 Para las proteínas de fusión sCD38 también se analizó la capacidad de la proteína de titular un anticuerpo como en la inhibición IAT del anti-CD38 (DARATUMUMAB) utilizando CD38ecd-Fc-10H como referencia.

Tabla 3. Grado de oligomerización de proteínas de fusión recombinantes

Proteína recombinante	Th. Mw (kDa)	Mw (kDa)	Mw/Th. Mw	Polidispersidad Mw/Mn	Rh*(w) (nm)	Grado de oligomerización	Funcionalidad
CD38ecd-Fc-10His	57	668,9 (0,1 %)	11,7	1,002 (0,2 %)	9,8 (7%)	12mero	100 %
CD38ecd-flex-Fc-10His	57	700,8 (0,6 %)	12,3	1,002 (0,8 %)	9,6 (6%)	12mero	100 %
CD38ecd-Fc	56	113,7 (0,8 %)	2,3	1,009 (1 %)	<9	2mero	50 %
CD38ecd-10His	31	35,6 (3 %)	1,2	1,000 (4 %)	< 9	1mero	12,5 %
CD47ecd1-Fc-10His	41	513,3 (0,9 %)	12,5	1,005 (1 %)	9,3 (28%)	12mero	nd
Gp1ba-Fc-G-8His + EDTA 10 mM	59	144 (1,842 %)	2,4	1,012 (2,6 %)	<9	2mero	N/A
Gp1ba-Fc-G-8His Sin tratamiento con EDTA	59	773 (1,5 %)	13	1,06 (2,34 %)	9,10 (44%)	12mero	N/A
Gp1ba-6His	33	36,23 (3 %)	1,1	1,016 (3,75 %)	<9	1mero	N/A
Gp1ba-SBP-6His	37	41,77 (0,6 %)	1,12	1,003 (0,88 %)	<9	1mero	N/A
Gp1ba-p53-6His	37	146 (1,081 %)	3,94	1,006(1,57 %)	<9	4mero	N/A
Fc-10His	30	393,6 (2 %)	13,12	1,072(3 %)	<9	12mero	0 %
flex-Fc-10His	30	303,5 (2 %)	10,1	1,021(3 %)	<9	10mero	0 %

*El Rh(w) de moléculas inferior a 9 nm es poco fiable.

Las etiquetas de oligomerización que comprenden la combinación específica de una región Fc y un dominio poli-His (Fc-poli-His) desencadenan la oligomerización (al menos 12mero o 6mero de dímeros), de al menos 3 proteínas de interés (sCD38, CD47ecd1 y Gp1ba) fusionadas a ellas en el extremo N-terminal. La etiqueta Fc-10His por sí misma sin estar fusionada a una proteína de interés también forma oligómeros. Los datos que se muestran en la tabla 3 indican claramente que la oligomerización es una propiedad intrínseca de las etiquetas Fc-poli-His que no está conectada a la proteína de interés utilizada. La oligomerización de la proteína de interés no es dependiente de la región bisagra de Fc, dado que las proteínas fusionadas a Flex-Fc-10His también muestran oligomerización. Las fusiones de proteínas que comprenden solo una etiqueta poli-His sin la región Fc no desencadenan ninguna oligomerización y las proteínas obtenidas son monómeros, tal como se esperaba. Todas las proteínas de fusión que comprenden una etiqueta de oligomerización Fc-poli-His son altamente monodispersas indicando que no son agregados de moléculas no plegadas.

Por último, la fusión de una etiqueta de oligomerización Fc-poli-His a proteínas sCD38 aumenta la avidez de CD38ecd al titular un anti-CD38.

Tal como se utiliza en el presente documento, los títulos de las secciones son para fines de organización solamente y no se deben interpretar como limitantes del objeto de ninguna manera. Cuando las definiciones de los términos en las referencias incorporadas parecen diferir de las definiciones proporcionadas en el presente documento, la definición proporcionada en el presente documento predominará.

En esta solicitud, la utilización del singular incluye el plural, a menos que específicamente se indique lo contrario. Además, la utilización de "comprender", "comprende", "que comprende", "contener", "contiene", "que contiene", "incluir", "incluye", y "que incluye" no pretenden ser limitantes.

Tal como se utiliza en la presente especificación y reivindicaciones, las formas del singular "un" "una", "el", y "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contenido dicte claramente lo contrario de otra forma.

ES 2 973 864 T3

Listado de secuencias

<110> GRIFOLS DIAGNOSTIC SOLUTIONS INC.

<120> COMPOSICIONES, MÉTODOS Y/O KITS QUE COMPRENDEN UN DOMINIO EXTRACELULAR DE CD38 RECOMBINANTE HUMANO

5

<130> 62543788

<150> 62/543788

<151> 10-08-2017

10

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 257

<212> PRT

<213> Sintético

20

<400> 1

Pro Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe
1 5 10 15

Pro Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro
20 25 30

Glu Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly
35 40 45

Ala Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln
50 55 60

Pro Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu
65 70 75 80

Leu Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln
85 90 95

Arg Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp
100 105 110

Asp Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln
115 120 125

Ser Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val
130 135 140

Phe Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val

ES 2 973 864 T3

145

150

155

160

Val His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn
165 170 175

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

Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg
195 200 205

Asp Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Ser Ile Ile Ser
210 215 220

Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys
225 230 235 240

Phe Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu
245 250 255

Ile

<210> 2

<211> 51

5 <212> PRT

<213> Sintético

<400> 2

Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Gln Ala Trp Val Ile His Gly
1 5 10 15

Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu
20 25 30

Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn
35 40 45

Ile Tyr Arg

50

<210> 3

<211> 12

15 <212> PRT

<213> Sintético

<400> 3

Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly
1 5 10

20

ES 2 973 864 T3

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Sintético
5
<400> 4

Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg
1 5 10

10 <210> 5
<211> 239
<212> PRT
<213> Sintético

15 <400> 5

His Gly Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val
1 5 10 15

Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val
20 25 30

Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile
35 40 45

Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val
50 55 60

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala
100 105 110

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr

ES 2 973 864 T3

۱۵

150

۱۵۰

280

Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr
 165 170 175

Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu
 180 185 190

Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser
195 200 205

Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser
210 215 220

His Ser Pro Gly Ile His
225 230 235

<210> 6

<211> 392

5 <212> PRT
<213> Sintético

<400> 6

Met His His His His His His His His His Gly Ser Lys Thr Glu
1 5 10 15

Gln Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly
20 25 30

Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val
 35 40 45

Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala
50 55 60

Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe
65 70 75 80

Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys
85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95

Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr
100 105 110

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

ES 2 973 864 T3

Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp Glu Glu
130 135 140

Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser Ala Leu
145 150 155 160

Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile Ala Ala
165 170 175

Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp Ile Lys
180 185 190

Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr Phe Leu
195 200 205

Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp Tyr Ser
210 215 220

Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr Ile Asn
225 230 235 240

Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn Tyr Gly
245 250 255

Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro Phe Val
260 265 270

Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu
275 280 285

Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu
290 295 300

Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr
305 310 315 320

Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn
325 330 335

Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe
340 345 350

Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln
355 360 365

ES 2 973 864 T3

Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn Ser Ser Ser Gly
370 375 380

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Thr
385 390

<210> 7

<211> 498

5 <212> PRT
<213> Sintético

<400> 7

Val Asp Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg
1 5 10 15

Phe Pro Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His
20 25 30

Pro Glu Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys
35 40 45

Gly Ala Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr
50 55 60

Gln Pro Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile
65 70 75 80

Leu Leu Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val
85 90 95

Gln Arg Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala
100 105 110

Asp Asp Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr
115 120 125

Gln Ser Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser
130 135 140

Val Phe Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp
145 150 155 160

Val Val His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys
165 170 175

ES 2 973 864 T3

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

Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser
195 200 205

Arg Asp Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile
210 215 220

Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp
225 230 235 240

Lys Phe Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser
245 250 255

Glu Ile Pro Pro Gly Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile
260 265 270

Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro
275 280 285

Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val
290 295 300

Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val
305 310 315 320

Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln
325 330 335

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln
340 345 350

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala
355 360 365

Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro
370 375 380

Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala
385 390 395 400

Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Gla
405 410 415

ES 2 973 864 T3

Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr
420 425 430

Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr
435 440 445

Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe
450 455 460

Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys
465 470 475 480

Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Ile His His His His His His His His
485 490 495

His His

<210> 8

<211> 270

5 <212> PRT
<213> Sintético

<400> 8

Val Asp Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg
1 5 10 15

Phe Pro Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His
20 25 30

Pro Glu Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys
35 40 45

Gly Ala Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr
50 55 60

Gln Pro Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile
65 70 75 80

Leu Leu Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val
85 90 95

Gln Arg Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala
100 105 110

ES 2 973 864 T3

Asp Asp Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr
115 120 125

Gln Ser Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser
130 135 140

Val Phe Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp
145 150 155 160

Val Val His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys
165 170 175

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

Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser
195 200 205

Arg Asp Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile
210 215 220

Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp
225 230 235 240

Lys Phe Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser
245 250 255

Glu Ile Gly Ile His
260 265 270

<210> 9

<211> 648

5 <212> PRT
<213> Sintético

<400> 9

Met His
1 5 10 15

Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly
20 25 30

Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val
35 40 45

10 Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala

ES 2 973 864 T3

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

ES 2 973 864 T3

290	295	300
Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr 305	310	315
Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn 325	330	335
Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe 340	345	350
Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln 355	360	365
Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn Ser Ser Ser Gly 370	375	380
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Thr Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly 385	390	395
Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val 405	410	415
Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser 420	425	430
Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn 435	440	445
Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr 450	455	460
Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala 465	470	475
His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr 485	490	495
Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn 500	505	510
Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys 515	520	525
Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe		

ES 2 973 864 T3

530 535 540

Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg
545 550 555 560

Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser Val Glu Val His
565 570 575

Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His
580 585 590

Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys
595 600 605

Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys
610 615 620

Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu
625 630 635 640

Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
645

<210> 10

<211> 278

5 <212> PRT
<213> Sintético

<400> 10

Met His His His His His His His His Gly Ser Gly Glu Asn
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gln Gly Thr Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly
20 25 30

Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr
35 40 45

Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp
50 55 60

Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr
65 70 75 80

Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro
85 90 95

ES 2 973 864 T3

Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln
100 105 110

Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu
115 120 125

Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser
130 135 140

Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn
145 150 155 160

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

Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys
180 185 190

Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser Val Glu Val His Asn Leu
195 200 205

Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly
210 215 220

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

Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile
245 250 255

Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser
260 265 270

Ser Cys Thr Ser Glu Ile
275

<210> 11

<211> 443

5 <212> PRT
<213> Sintético

<400> 11

Met His His His His His His His His Gly Ser Lys Thr Glu
1 5 10 15

ES 2 973 864 T3

Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly
20 25 30

Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val
35 40 45

Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala
50 55 60

Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe
65 70 75 80

Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys
85 90 95

Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr
100 105 110

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

Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp Glu Glu
130 135 140

Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser Ala Leu
145 150 155 160

Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile Ala Ala
165 170 175

Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp Ile Lys
180 185 190

Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr Phe Leu
195 200 205

Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp Tyr Ser
210 215 220

Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr Ile Asn
225 230 235 240

Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn Tyr Gly
245 250 255

ES 2 973 864 T3

Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro Phe Val
260 265 270

Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu
275 280 285

Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu
290 295 300

Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr
305 310 315 320

Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn
325 330 335

Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe
340 345 350

Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln
355 360 365

Thr Val Asp Gln Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn Ser Ser Ser Gly
370 375 380

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Thr Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr
385 390 395 400

Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu
405 410 415

Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg
420 425 430

Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg
435 440

<210> 12

<211> 497

5 <212> PRT
<213> Sintético

<400> 12

10 Val Asp Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg
1 5 10 15

ES 2 973 864 T3

Phe Pro Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His
20 28 30

Pro Glu Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys
35 40 45

Gly Ala Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr
50 55 60

Gln Pro Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile
65 70 75 80

Leu Leu Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val
85 90 95

Gln Arg Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala
100 105 110

Asp Asp Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr
115 120 125

Gln Ser Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser
130 135 140

Val Phe Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp
145 150 155 160

Val Val His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys
165 170 175

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

Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser
195 200 205

Arg Asp Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile
210 215 220

Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp
225 230 235 240

Lys Phe Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser
245 250 255

ES 2 973 864 T3

Glu Ile Pro Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
260 265 270

Ser Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
275 280 285

Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
290 295 300

Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
305 310 315 320

Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
325 330 335

Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
340 345 350

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
355 360 365

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys
370 375 380

Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys
385 390 395 400

Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
405 410 415

Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
420 425 430

Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
435 440 445

Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
450 455 460

Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
465 470 475 480

Leu Ser His Ser Pro Gly Ile His His His His His His His His His
485 490 495

His

ES 2 973 864 T3

<211> 488
<212> PRT
<213> Sintético

5 <400> 13

Val Asp Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg
1 5 10 15

Phe Pro Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His
20 25 30

Pro Glu Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys
35 40 45

Gly Ala Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr
50 55 60

Gln Pro Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile
65 70 75 80

Leu Leu Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val
95 90 95

Gln Arg Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala
100 105 110

Asp Asp Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr
115 120 125

Gln Ser Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser
130 135 140

Val Phe Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp
145 150 155 160

Val Val His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys
165 170 175

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

Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser

ES 2 973 864 T3

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

ES 2 973 864 T3

435

440

445

Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe
 450 455 460

Thr Cys Ser Val Leu His Gln Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys
 465 470 475 480

Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Ile
 485

<210> 14

<211> 281

5 <212> PRT
 <213> Sintético

<400> 14

Val Asp Arg Trp Arg Gln Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg
 1 5 10 15

Phe Pro Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His
 20 25 30

Pro Glu Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys
 35 40 45

GLY Ala Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr
 50 55 60

Gln Pro Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile
 65 70 75 80

Leu Leu Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val
 85 90 95

Gln Arg Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala
 100 105 110

Asp Asp Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr
 115 120 125

Gln Ser Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser
 130 135 140

Val Phe Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp
 145 150 155 160

ES 2 973 864 T3

Val Val His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys
165 170 175

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

Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser
195 200 205

Arg Asp Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile
210 215 220

Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp
225 230 235 240

Lys Phe Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser
245 250 255

Glu Ile Pro Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser His
260 265 270

His His His His His His His His
275 280

<210> 15

<211> 252

5 <212> PRT

<213> Sintético

<400> 15

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

Arg Pro His Arg Ser Asp Leu Pro Gly Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
20 25 30

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
35 40 45

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
50 55 60

Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
65 70 75 80

ES 2 973 864 T3

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
85 90 95

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

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
115 120 125

Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
130 135 140

Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
145 150 155 160

Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
165 170 175

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gln Pro
180 185 190

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
195 200 205

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
210 215 220

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
225 230 235 240

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Ile
245 250

<210> 16

<211> 262

5 <212> PRT
<213> Sintético

<400> 16

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

Arg Pro His Arg Ser Asp Leu Pro Gly Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
20 25 30

ES 2 973 864 T3

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
35 40 45

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
50 55 60

Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
65 70 75 80

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
85 90 95

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

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
115 120 125

Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
130 135 140

Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
145 150 155 160

Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
165 170 175

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
180 185 190

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
195 200 205

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
210 215 220

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
225 230 235 240

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Ile His His His His
245 250 255

His His His His His His
260

<210> 17

<211> 261

5 <212> PRT

ES 2 973 864 T3

<213> Sintético

<400> 17

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

Arg Pro His Arg Ser Asp Leu Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Ser Gly Gly Ser Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro
35 40 45

Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr
50 55 60

Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser
65 70 75 80

Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg
85 90 95

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile
100 105 110

Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn
115 120 125

Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
130 135 140

Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu
145 150 155 160

Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe
165 170 175

Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala
180 185 190

Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr
195 200 205

Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly

ES 2 973 864 T3

Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His
225 230 235 240

Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Ile His His His His His His
245 250 255

His His His His His
260

<210> 18

<211> 236

5 <212> PRT
<213> Sintético

<400> 18

Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu
1 5 10 15

Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr
20 25 30

Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys
 35 40 45

Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val
50 55 60

His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
65 70 75 80

Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val
 118 120 125

Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu
 145 150 155 160

ES 2 973 864 T3

Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro
165 170 175

Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val
180 185 190

Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu
195 200 205

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser
210 215 220

Pro Gly Ile Gly His His His His His His His His His
225 230 235

<210> 19

<211> 421

5 <212> PRT

<213> Sintético

<400> 19

Met His His His His His His His His His Gly Ser Lys Thr Glu
1 5 10 15

Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly
20 25 30

Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val
35 40 45

Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala
50 55 60

Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe
65 70 75 80

Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys
85 90 95

Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr
100 105 110

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

ES 2 973 864 T3

Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp Glu Glu
130 135 140

Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser Ala Leu
145 150 155 160

Met Phe Asn Leu Gin Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile Ala Ala
165 170 175

Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp Ile Lys
180 185 190

Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr Phe Leu
195 200 205

Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp Tyr Ser
210 215 220

Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr Ile Asn
225 230 235 240

Gly Pro Trp Ala Try Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn Tyr Gly
245 250 255

Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gin Pro Ser Lys Pro Phe Val
260 265 270

Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu
275 280 285

Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu
290 295 300

Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr
305 310 315 320

Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn
325 330 335

Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe
340 345 350

Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln
355 360 365

ES 2 973 864 T3

Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn Ser Ser Ser Gly
370 375 380

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Thr Gly Thr Ser Asn Ala Ser Arg Ser
385 390 395 400

Ala Gly Ser Thr Pro Gly Ser Ser Gly Arg Thr Ser Pro Ser Pro Ser
405 410 415

Leu Ser Leu Ile Ser
420

<210> 20

<211> 365

5 <212> PRT
<213> Sintético

<400> 20

Val Asp Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
1 5 10 15

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
20 25 30

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
35 40 45

Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
50 55 60

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

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
85 90 95

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Gln Gly Glu Thr Ile Ile Glu
100 105 110

Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Gly Pro Gly
115 120 125

Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu
130 135 140

ES 2 973 864 T3

Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr
145 150 155 160

Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys
165 170 175

Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val
180 185 190

His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
195 200 205

Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
210 215 220

Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile
225 230 235 240

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val
245 250 255

Tyr Thr Ile Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser
260 265 270

Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu
275 280 285

Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro
290 295 300

Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val
305 310 315 320

Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu
325 330 335

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser
340 345 350

Pro Gly Ile His
355 360 365

<210> 21

<211> 526

5 <212> PRT

<213> Sintético

<400> 21

ES 2 973 864 T3

His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
1 5 10 15

Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
20 25 30

Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
35 40 45

Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
50 55 60

Ser Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
65 70 75 80

Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
85 90 95

Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
100 105 110

Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
115 120 125

Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu
130 135 140

Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu
145 150 155 160

Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp Thr
165 170 175

Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe Phe
180 185 190

Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp Leu
195 200 205

Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn Ala
210 215 220

Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Thr Val Asp Val Lys Ala Met Thr

ES 2 973 864 T3

225

230

235

240

Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro Val
245 250 255

Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly Asp
260 265 270

Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp Lys
275 280 285

Val Arg Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val
290 295 300

Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val
305 310 315 320

Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile
325 330 335

Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val
340 345 350

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
355 360 365

Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu
370 375 380

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala
385 390 395 400

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro
405 410 415

Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys
420 425 430

Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr
435 440 445

Val Gln Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr
450 455 460

Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu

ES 2 973 864 T3

465

470

475

480

Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser
 485 490 495

Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser
 500 505 510

His Ser Pro Gly Ile Gly His
 515 520 525

<210> 22

<211> 334

5 <212> PRT

<213> Sintético

<400> 22

His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
 1 5 10 15

Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
 20 25 30

Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
 35 40 45

Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
 50 55 60

Ser Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
 65 70 75 80

Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
 85 90 95

Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
 100 105 110

Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
 115 120 125

Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu
 130 135 140

Leu Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu
 145 150 155 160

10

ES 2 973 864 T3

Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp Thr
165 170 175

Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe Phe
180 185 190

Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp Leu
195 200 205

Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn Ala
210 215 220

Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Thr Val Asp Val Lys Ala Met Thr
225 230 235 240

Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro Val
245 250 255

Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly Asp
260 265 270

Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp Lys
275 280 285

Val Arg Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val
290 295 300

Glu Gly Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His
305 310 315 320

His Pro Gln Gly Gln Arg Glu Pro His His His His His His
325 330

<210> 23

<211> 296

5 <212> PRT
<213> Sintético

<400> 23

His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
1 5 10 15

Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
20 25 30

ES 2 973 864 T3

Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
35 40 45

Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
50 55 60

Ser Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
65 70 75 80

Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
85 90 95

Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
100 105 110

Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
115 120 125

Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Gln Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu
130 135 140

Thr Pro Thr Pro Lys Leu Gln Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu
145 150 155 160

Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp Thr
165 170 175

Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe Phe
180 185 190

Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp Leu
195 200 205

Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn Ala
210 215 220

Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Val Val Asp Val Lys Ala Val Thr
225 230 235 240

Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro Val
245 250 255

Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly Asp
260 265 270

ES 2 973 864 T3

Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp Lys
275 280 285

Val Arg His His His His His His
290 295

<210> 24

<211> 336

5 <212> PRT
<213> Sintético

<400> 24

His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
1 5 10 15

Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
20 25 30

Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
35 40 45

Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
50 55 60

Ser Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
65 70 75 80

Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
85 90 95

Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
100 105 110

Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
115 120 125

Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu
130 135 140

Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu
145 150 155 160

Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp Thr
165 170 175

ES 2 973 864 T3

Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe Phe
180 185 190

Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp Leu
195 200 205

Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn Ala
210 215 220

Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Thr Val Asp Val Lys Ala Met Thr
225 230 235 240

Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro Val
245 250 255

Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly Asp
260 265 270

Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp Lys
275 280 285

Val Arg Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly
290 295 300

Arg Glu Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu
305 310 315 320

Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly His His His His His His
325 330 335

<210> 25

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Sintético

<400> 25

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn
1 5 10 15

Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
20 25 30

Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
35 40 45

Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser

ES 2 973 864 T3

50

55

60

Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
 85 90 95

Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
 100 105 110

Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu
 115 120

<210> 26

<211> 290

5 <212> PRT
 <213> Sintético

<400> 26

His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
 1 5 10 15

Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
 20 25 30

Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
 35 40 45

Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
 50 55 60

Ser Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
 65 70 75 80

Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
 85 90 95

Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
 100 105 110

Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
 115 120 125

Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu
 130 135 140

ES 2 973 864 T3

Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu
145 150 155 160

Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp Thr
165 170 175

Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe Phe
180 185 190

Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp Leu
195 200 205

Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn Ala
210 215 220

Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Thr Val Asp Val Lys Ala Met Thr
225 230 235 240

Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro Val
245 250 255

Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly Asp
260 265 270

Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp Lys
275 280 285

Val Arg
290

<210> 27

<211> 290

5 <212> PRT

<213> Sintético

<400> 27

His Pro Ile Cys Glu Val Ser Lys Val Ala Ser His Leu Glu Val Asn
1 5 10 15

Cys Asp Lys Arg Asn Leu Thr Ala Leu Pro Pro Asp Leu Pro Lys Asp
20 25 30

Thr Thr Ile Leu His Leu Ser Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Phe Ser Leu
35 40 45

ES 2 973 864 T3

Ala Thr Leu Met Pro Tyr Thr Arg Leu Thr Gln Leu Asn Leu Asp Arg
50 55 60

Ser Glu Leu Thr Lys Leu Gln Val Asp Gly Thr Leu Pro Val Leu Gly
65 70 75 80

Thr Leu Asp Leu Ser His Asn Gln Leu Gln Ser Leu Pro Leu Leu Gly
85 90 95

Gln Thr Leu Pro Ala Leu Thr Val Leu Asp Val Ser Phe Asn Arg Leu
100 105 110

Thr Ser Leu Pro Leu Gly Ala Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Gln Glu
115 120 125

Leu Tyr Leu Lys Gly Asn Glu Leu Lys Thr Leu Pro Pro Gly Leu Leu
130 135 140

Thr Pro Thr Pro Lys Leu Glu Lys Leu Ser Leu Ala Asn Asn Asn Leu
145 150 155 160

Thr Glu Leu Pro Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Glu Asn Leu Asp Thr
165 170 175

Leu Leu Leu Gln Glu Asn Ser Leu Tyr Thr Ile Pro Lys Gly Phe Phe
180 185 190

Gly Ser His Leu Leu Pro Phe Ala Phe Leu His Gly Asn Pro Trp Leu
195 200 205

Cys Asn Cys Glu Ile Leu Tyr Phe Arg Arg Trp Leu Gln Asp Asn Ala
210 215 220

Glu Asn Val Tyr Val Trp Lys Gln Val Val Asp Val Lys Ala Val Thr
225 230 235 240

Ser Asn Val Ala Ser Val Gln Cys Asp Asn Ser Asp Lys Phe Pro Val
245 250 255

Tyr Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Cys Pro Thr Leu Gly Asp Glu Gly Asp
260 265 270

Thr Asp Leu Tyr Asp Tyr Tyr Pro Glu Glu Asp Thr Glu Gly Asp Lys
275 280 285

Val Arg
280

<210> 28

ES 2 973 864 T3

<211> 11
<212> PRT
<213> Sintético

5 <400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

10 <210> 29

<211> 13
<212> PRT
<213> Sintético

15 <400> 29

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5 10

20 <210> 30

<211> 13
<212> PRT
<213> Sintético

25 <400> 30

Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una etiqueta de oligomerización para una proteína de fusión recombinante, la etiqueta de oligomerización comprende una región Fc de inmunoglobulina o un fragmento de la misma y un dominio poli-His, en donde el dominio poli-His contiene 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de histidina.
5
2. La etiqueta de oligomerización de la reivindicación 1, en donde la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina es SEQ ID NO: 15.
- 10 3. La etiqueta de oligomerización de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina tiene al menos el 90% de identidad con SEQ ID NO: 15.
4. La etiqueta de oligomerización de la reivindicación 1, en donde la secuencia de la etiqueta de oligomerización se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.
15
5. Una proteína de fusión que comprende un polipéptido recombinante fusionado a una etiqueta de oligomerización según la reivindicación 1.
- 20 6. La proteína de fusión de la reivindicación 5 en donde la etiqueta de oligomerización es capaz de formar un orden superior de dímeros hasta 12meros o 6meros de 2meros.
7. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina es SEQ ID NO: 15.
- 25 8. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina tiene al menos el 90% de identidad con SEQ ID NO: 15.
9. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde la secuencia del polipéptido recombinante se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 25, o SEQ ID NO: 26.
30
10. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 o 8, en donde la secuencia de la proteína de fusión se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20, y SEQ ID NO: 21.
- 35 11. Método para la oligomerización de una proteína de fusión recombinante que comprende las etapas de:
 - a) fusionar genéticamente una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta de oligomerización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido;
 - 40 b) expresar la secuencia de nucleótido resultante de la etapa a) en una célula huésped;
 - c) purificar la proteína de fusión recombinante obtenida en la etapa b).

ES 2 973 864 T3

二

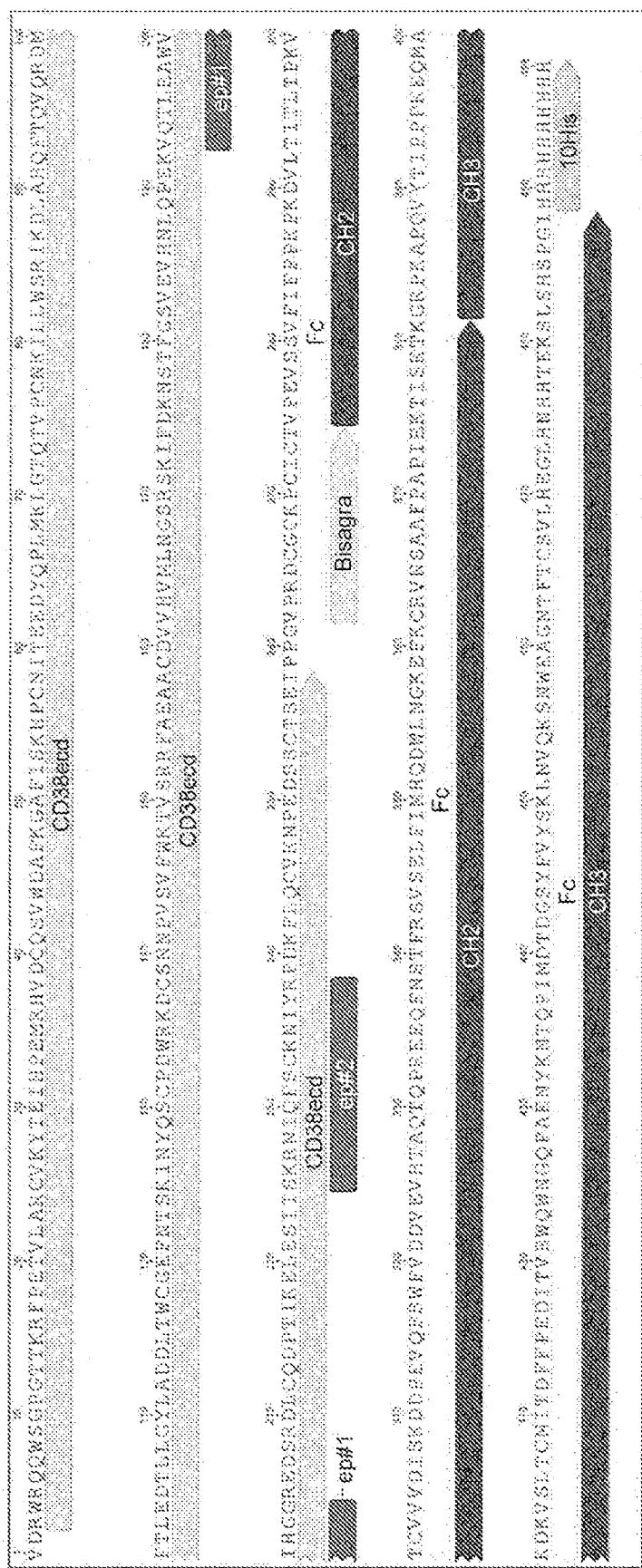


FIG. 2

VDRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPMRHV
DCQSVWDASFKAFIGAFISKHPCNITEEDYQPLMKGTLQTVP
NKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLT
WCGEFNTSKINYQSCPWRKDSCNNPVSFWKTVSRRF
AEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNQPEK
VQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESHSKRNIQFSC
KNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEIGIHHHHHHHHH
(SEQ ID NO: 8)

ES 2 973 864 T3

FIG. 3

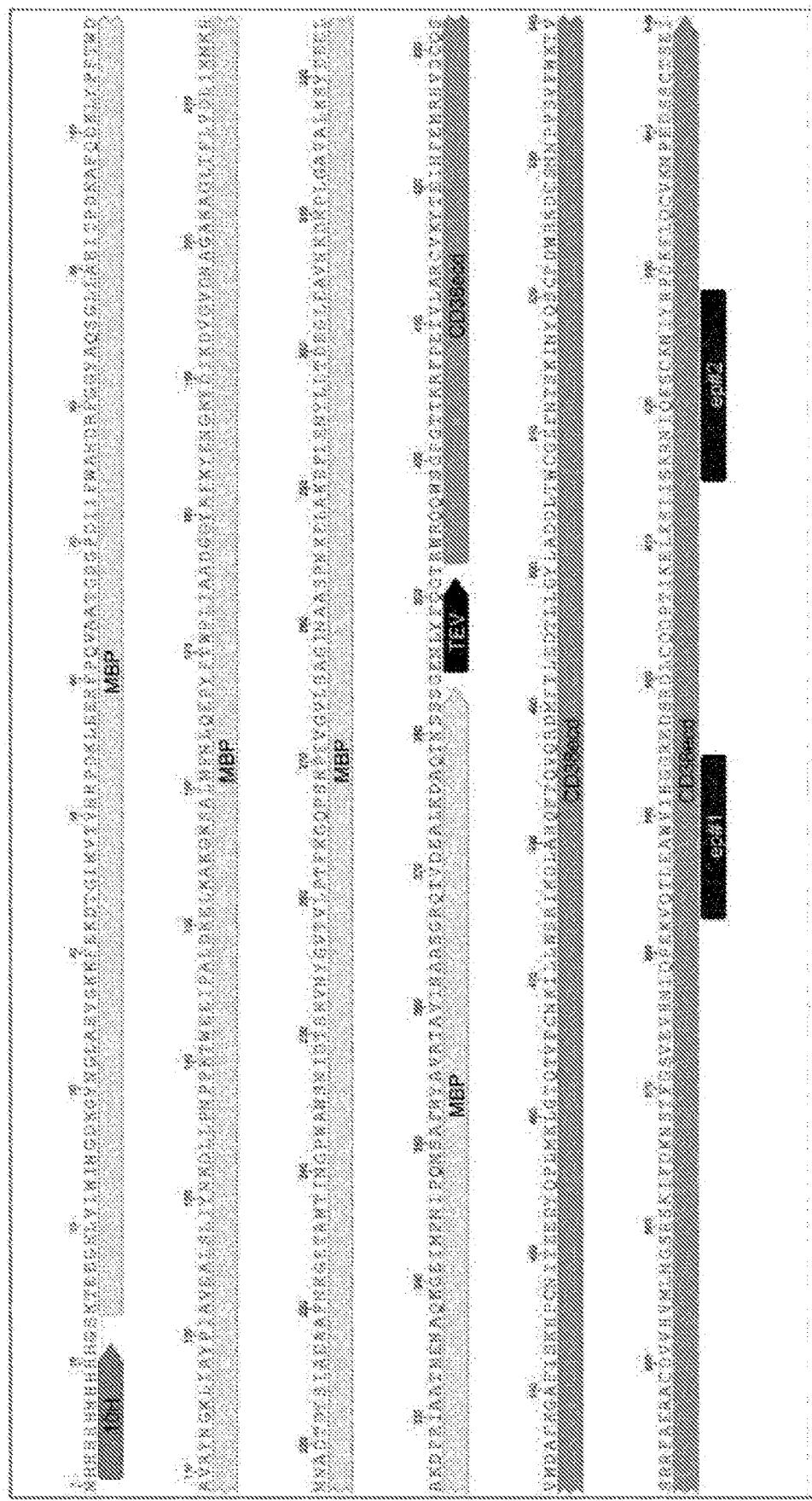


FIG. 4

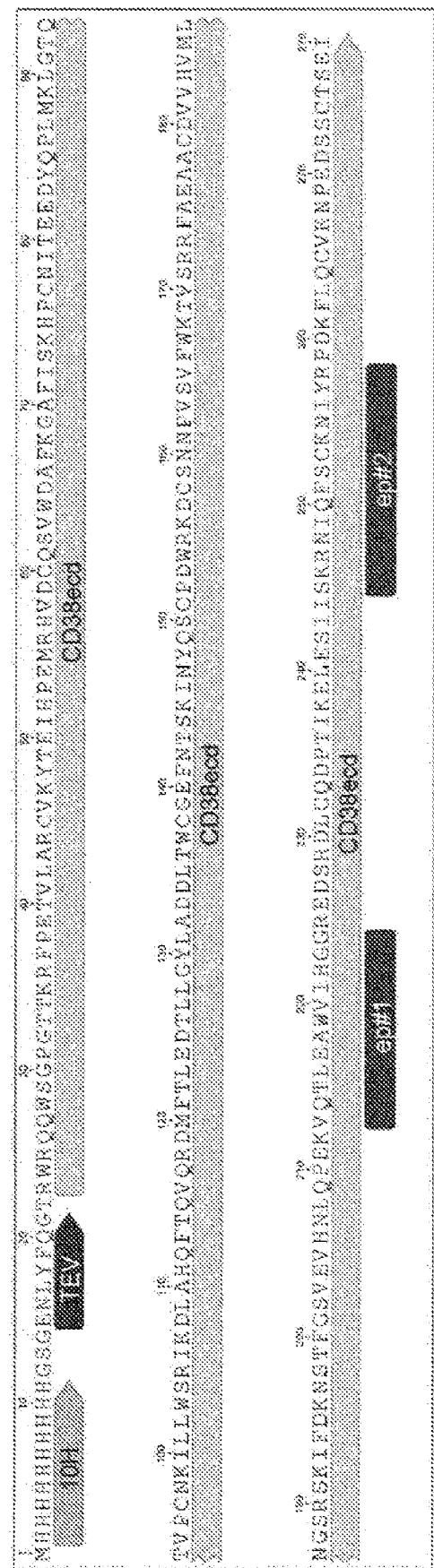


FIG. 5

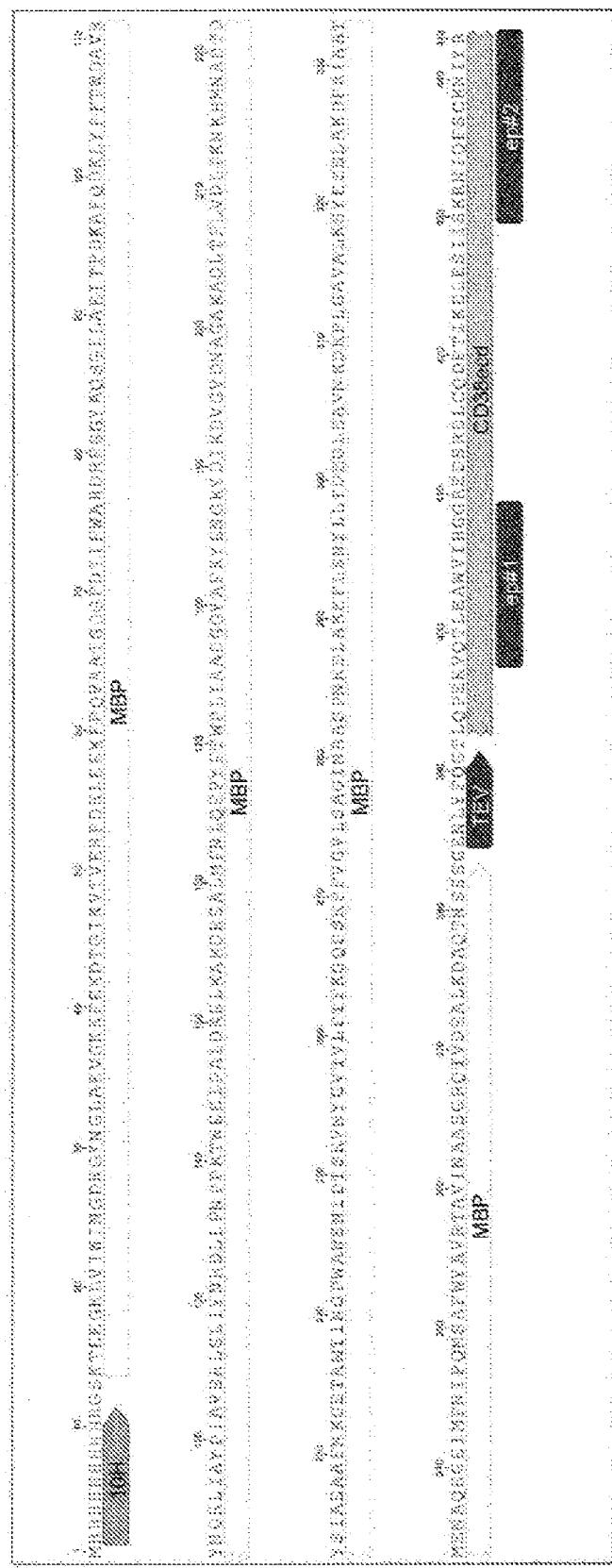


FIG. 6

PRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPMRHVD
CQSVWDASFKAFIGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCN
KILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLTW
CGEFNTSKINYQSCPWRKDSCSNNPVSFWKTVSRRFAE
AACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQ
TLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESHSKRNIQFSCKNI
YRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI (SEQ ID NO: 1)

FIG. 7

LQPEKVQTLEAWVIIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRN
IQFSCKNIYR (SEQ ID NO: 2)

FIG. 8

VQTLEAWVIHGG (SEQ ID NO: 3)

ES 2 973 864 T3

FIG. 9

SKRNIQFSCKNIYR (SEQ ID NO: 4)

FIG. 10

HGVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKV
TCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNS
TFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK
TKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDVKSLTCMITDFFPEDIT
VEWQWNGQPAENYKNTQPIMTDGSYFVYSKLNVQKS
NWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGIHHHHHHHH
HHH (SEQ ID NO: 5)

FIG. 11

MHHHHHHHHHGSKTEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVG
KKFEKDTGIKVTVHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWA
HDRFGGYAQSGLLAEITPDKAHQDKLYPFTWDARVYNG
KLIAYPLAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEIIPALDKEKAK
GKSALMFNLQE PYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKD
VGVDNAGAKAGLFLVDLIKHNHMNADTDYSIAEAAFN
KGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKP
FVGVL SAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKD
KPLGAVALKS YEEELAKDPRIAATMENAQKG EIMPNI PQ
MSAFWYAVRTAVINAASGRQTVD EALKDAQTNSSSGEN
LYFQGT (SEQ ID NO: 6)

FIG. 12

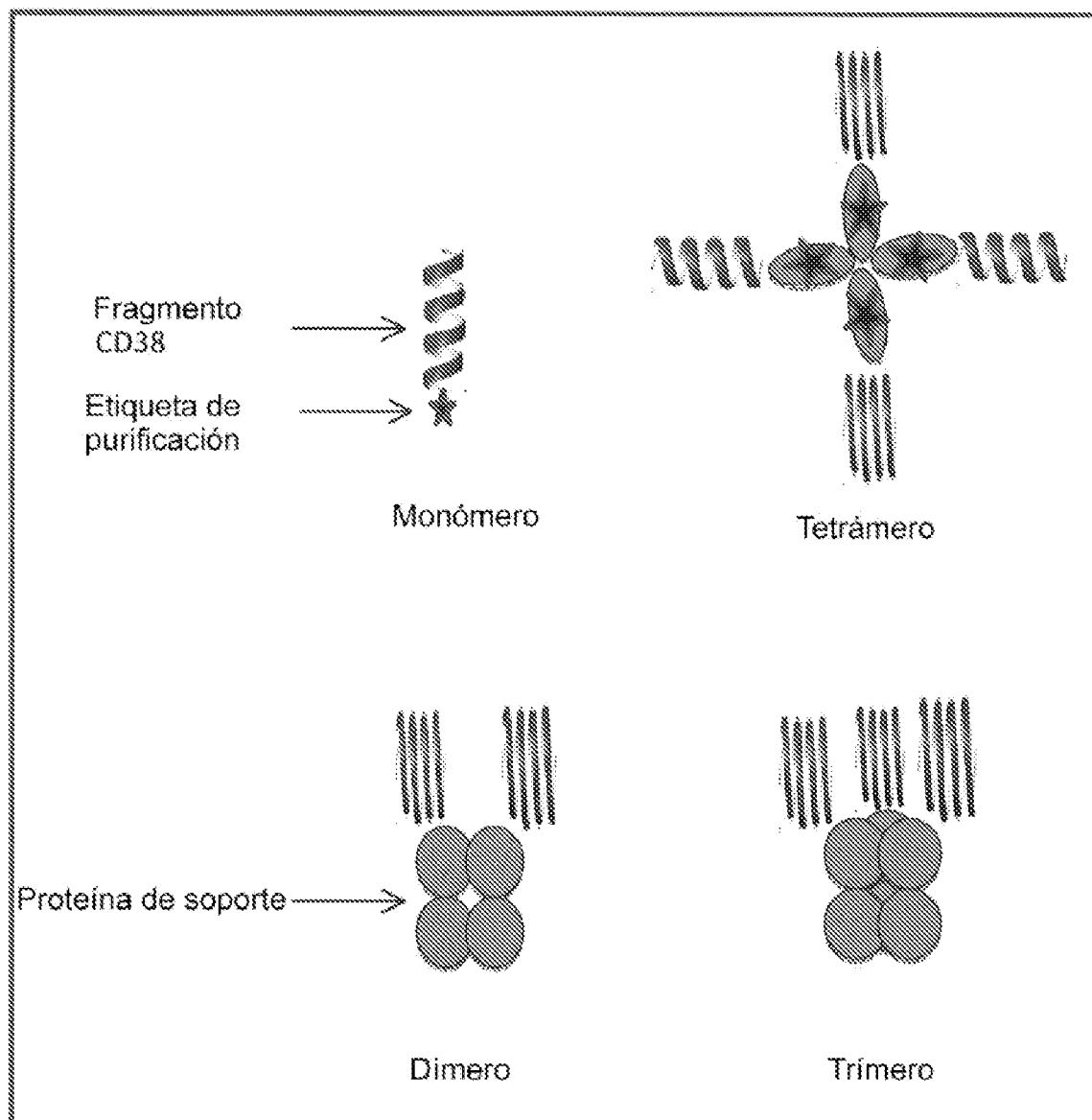


FIG. 13

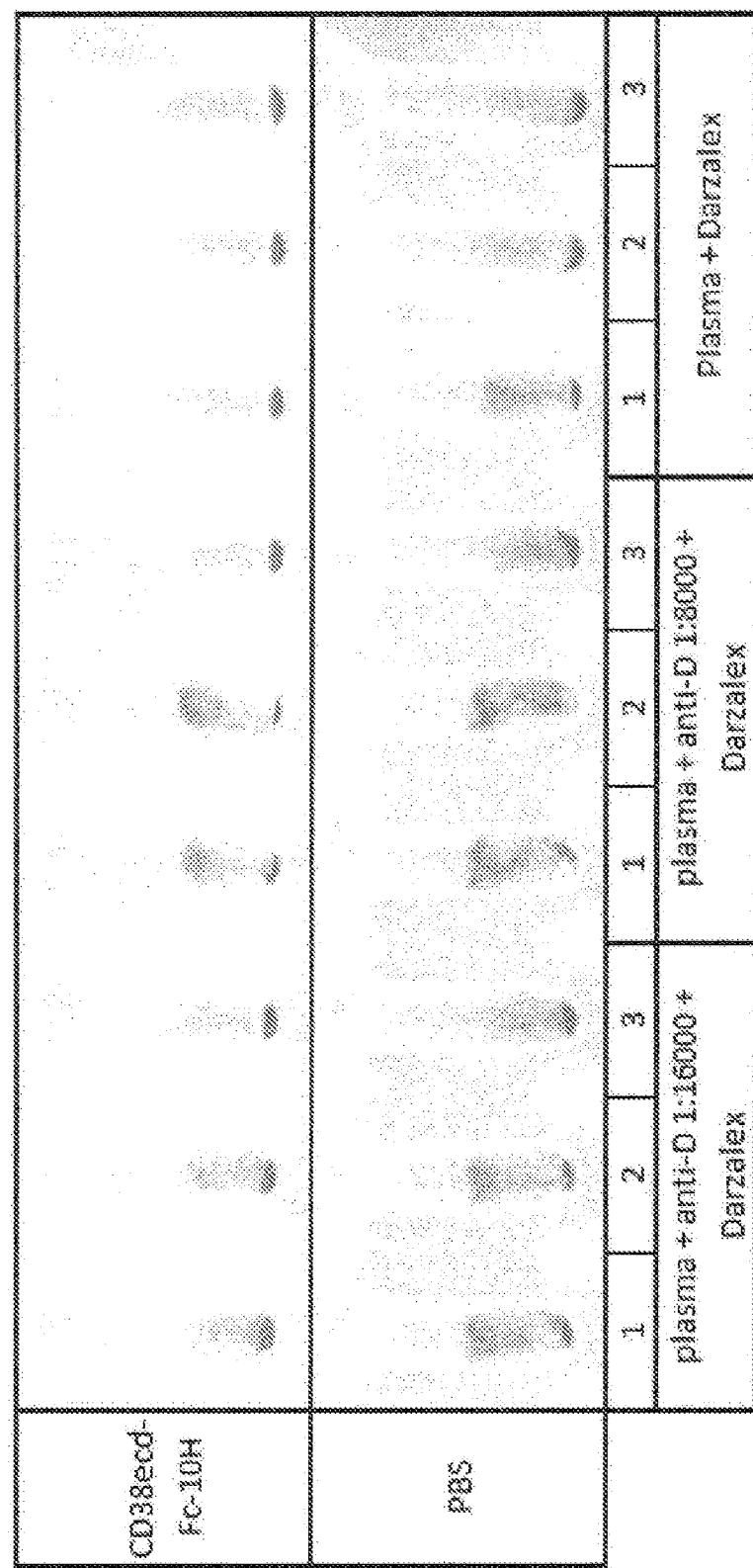
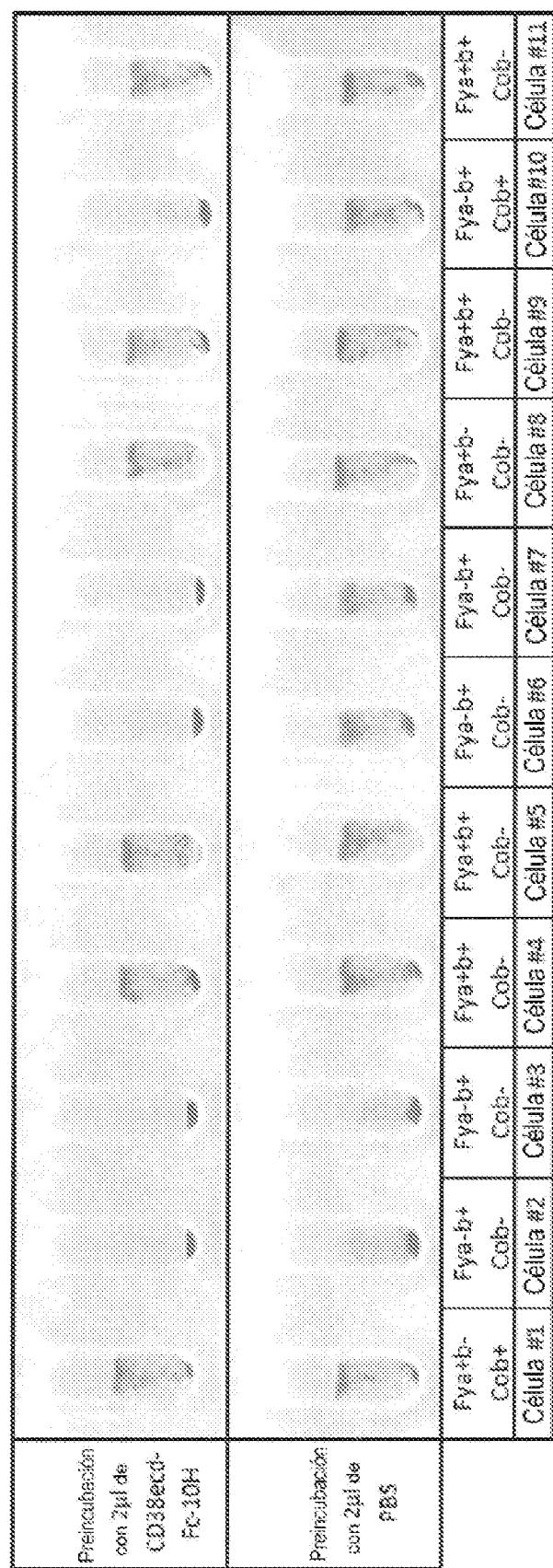


FIG. 14



	Fya+b+ Cob+	Fya-b+ Cob-	Fya+b+ Cob-	Fya+b+ Cob-	Fya+b+ Cob-	Fya+b+ Cob-
Célula #1	Célula #2	Célula #3	Célula #4	Célula #5	Célula #6	Célula #7
Prelinfusión con 2ml de CD38ect- Fc-10E1						
Prelinfusión con 2ml de PBS						

FIG. 15

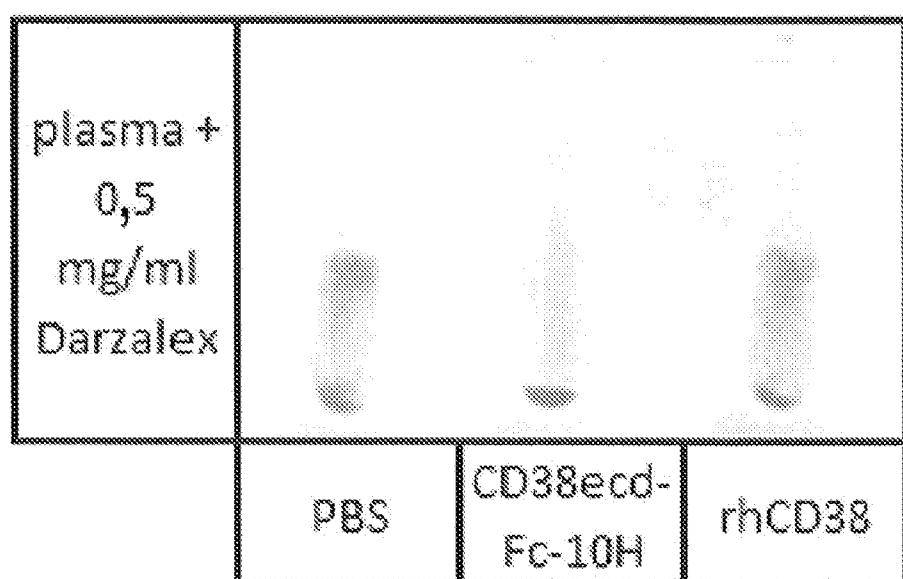


FIG. 16

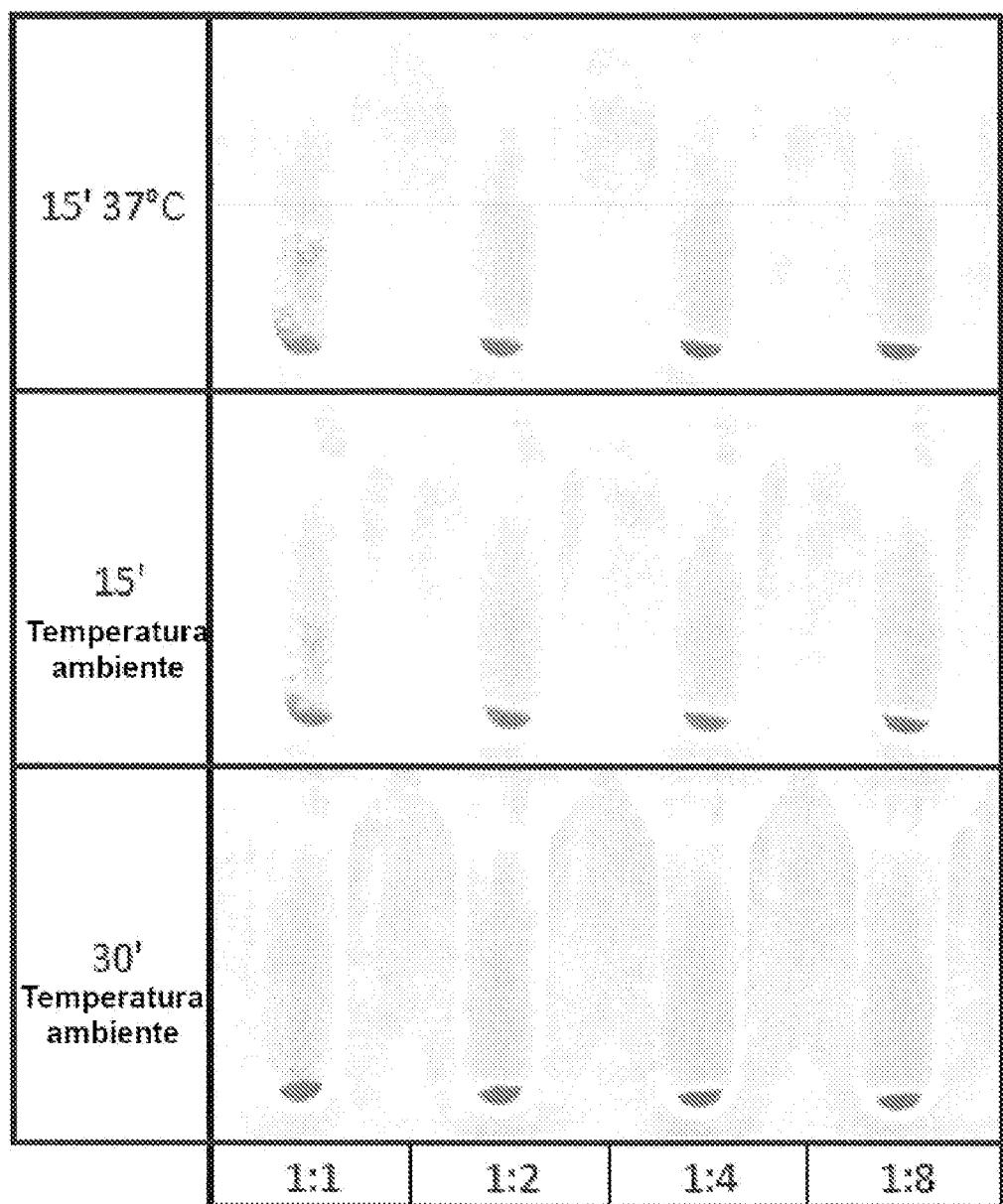


FIG. 17

