

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 866 202**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2016 PCT/US2016/025868**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016 WO16164305**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2016 E 16777107 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021 EP 3280432**

54 Título: **Polipéptidos que contienen dominios de unión de *novo* y usos de los mismos**

30 Prioridad:

06.04.2015 US 201562143772 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2021

73 Titular/es:

**SUBDOMAIN LLC (50.0%)
3142 Quesada Street NW
Washington, DC 20015, US y
ARCELLX, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LAFLEUR, DAVID, WILLIAM y
HILBERT, DAVID, M.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 866 202 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

Polipéptidos que contienen dominios de unión *de novo* y usos de los mismos

5 Casos relacionados

Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud Provisional de Estados Unidos con N.º de Serie: 62/143.772, presentada el 6 de abril de 2015.

10 Referencia al listado de secuencias

La presente solicitud ha sido presentada acompañada por un Listado de Secuencias en formato electrónico.

Antecedentes de la invención

15 Los reactivos basados en anticuerpos han acelerado el ritmo de la investigación y desarrollo biológicos. Las composiciones de anticuerpos representan una de las clases más importantes y exitosas de agentes terapéuticos y de diagnóstico utilizados en la industria farmacéutica. Sin embargo, el costo, el tiempo y la eficacia han motivado el desarrollo de reactivos de afinidad alternativos.

20 Ha surgido una variedad de formatos de unión distintos de anticuerpos para aplicaciones desempeñadas históricamente por anticuerpos. Mientras que se han reportado muchos éxitos para péptidos lineales, no estructurados, se han logrado resultados más consistentes al imponer una restricción estructural sobre la secuencia de péptidos - típicamente a través de la introducción de un enlace de disulfuro. Esta restricción proporciona una afinidad más alta y una especificidad mayor a través de la termodinámica más favorables de complementariedad de forma fija y presentaciones de residuos en la superficie (por ejemplo, aminoácidos hidrófobos) que podrían ser ocultos de otra manera y por lo tanto no estar orientados hacia un objetivo (Ladner, Trends in Biotech. 13(10):426-430, 1995). Por el contrario, los formatos que contienen enlaces de disulfuro son propensos típicamente al apareamiento inadecuado de cisteínas, ya sea intra-dominio o inter-dominio, que puede conducir a una expresión, rendimiento del producto y calidad del producto más bajas.

La estructura encontrada en subdominios de proteínas ha proporcionado otra fuente de restricción estructural. Las estructuras tales como repeticiones de fibronectina tipo III (adnectinas), proteínas z (aficuerpos), knottinas, lipocalinas (anticalinas) y repeticiones de anquirina (DARPinas) han sido desarrolladas con afinidades similares a anticuerpos contra una variedad de diferentes objetivos (Hey y colaboradores, Trends in Biotech. 23(10):514-422, 2005). Estos dominios contienen típicamente dos cualidades que son análogas a los armazones y regiones determinantes de complementariedad (CDRs, por sus siglas en inglés) encontrados en dominios variables de anticuerpo: un andamiaje estructural que confiere una alta estabilidad termodinámica y residuos o bucles que forman la base de la variabilidad de colecciones de expresión.

40 Sumario de la invención

En general, persiste la necesidad sustancial no cubierta de nuevos agentes y composiciones que se unen a objetivos, y particularmente de estos agentes que contienen andamiajes de unión alternativos (por ejemplo, andamiajes distintos de anticuerpos). En varias modalidades, los agentes de interés particular se pueden caracterizar, por ejemplo, por costos de producción sustancialmente reducidos y/o propiedades de reactivos, de diagnóstico y/o terapéuticas comparables o superiores en comparación con los anticuerpos. La presente descripción proporciona estos agentes deseables en varias modalidades. Por ejemplo, en varias modalidades, la presente descripción proporciona ciertos agentes de polipéptidos que se caracterizan por una alta afinidad de unión a objetivos y por un andamiaje estructural distinto de anticuerpos. Alternativa o adicionalmente, en varias modalidades, los agentes que se unen a objetivos, tales como los polipéptidos dados a conocer en este documento, que resultan por ejemplo de los métodos de producción dados a conocer en este documento tienen ventajas que incluyen, por ejemplo, una unión sumamente específica a objetivos. En algunas modalidades, esto se puede utilizar ventajosamente para fijar como objetivo agentes terapéuticos (por ejemplo, células inmunes) hacia células particulares (por ejemplo, células enfermas), reduciendo o eliminando en consecuencia los efectos no específicos. En algunas modalidades, los agentes proporcionados en este documento, tales como los polipéptidos específicos para objetivos, se pueden utilizar como productos terapéuticos proteínicos para unirse a células o factores solubles involucrados en una enfermedad. En algunas modalidades, los agentes proporcionados se pueden utilizar para purificar objetivos (por ejemplo, proteínas u otros objetivos) con un alto grado de especificidad, lo cual puede dar por resultado, por ejemplo, una pureza más alta y/o procesamiento corriente abajo reducido para purificar un objetivo.

Varias modalidades de las invenciones dadas a conocer en este documento se refieren a agentes que se unen específicamente a objetivos de interés, tales como los polipéptidos (DBDpp) que contienen dominios de unión *de novo* (DBD) dados a conocer en este documento. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los DBDpp y vectores y células hospedantes que contienen los ácidos nucleicos, como son colecciones de DBDpp y métodos para producir y examinar estas colecciones y los DBDpp identificados de estas colecciones y/o exámenes. También se

proporcionan DBDpp que incluyen proteínas de fusión de DBDpp, como son métodos para hacer y utilizar los DBDpp. Los ejemplos no limitantes de estos usos incluyen, pero no están limitados a, purificación por afinidad, análisis de objetivos, aplicaciones de diagnóstico y/o terapéuticas. Específicamente, la presente invención proporciona un polipéptido de unión a objetivo que comprende una secuencia de aminoácidos de

5

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAE₃₀LAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YK
GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAE₃₂AAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKKGKGNPEVE
ALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAE₃₂AAFEKEIAAFESSELQAYKKGKGNPEVE
X₅₅LRX₅₈X₅₉AAAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAE₃₂AAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKKGK
GNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAE₃₀LAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YK
KGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NP
EVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:7),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEALX₅₂
X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:8),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAAFEKEIAAFESSELQAYZ₂NPEVEX₅₀LR
X₅₃X₅₄AAAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:9),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPE
VEX₅₀LRX₅₃X₅₄AAAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10)

o

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NP
EVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11),

10

en donde

(a) X_n es un aminoácido natural o no natural;(b) Z₁ y Z₂ comprenden entre 2 y 30 aminoácidos naturales o no naturales;

(c) el polipéptido de unión a objetivo se une a un objetivo de interés, en donde la unión específica del polipéptido

15

de unión a objetivo al objetivo de interés es mayor que la unión de un polipéptido de referencia que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 al objetivo de interés; y
(d) el polipéptido de unión a objetivo no comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:50.

- 5 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de unión a objetivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención también proporciona un equipo que comprende el polipéptido de unión a objetivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6. En un aspecto adicional la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de unión a objetivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 10 En aspectos adicionales la invención proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 9 y que comprende opcionalmente además una secuencia de nucleótidos que regula la expresión del polipéptido de unión a diana codificado por la molécula de ácido nucleico o una célula hospedante que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9 o el vector de la reivindicación 10.
- 15 En un aspecto adicional la invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende (a) un dominio de direccionamiento, (b) un dominio transmembrana y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el dominio de direccionamiento comprende el polipéptido de unión a objetivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- En un aspecto adicional la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia que codifica el CAR de la reivindicación 13 o la reivindicación 14.
- 20 En otro aspecto la invención proporciona una célula que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el CAR de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, opcionalmente en donde la célula es una célula T o una célula asesina natural (NK, por sus siglas en inglés) y opcionalmente en donde la célula exhibe una inmunidad antitumoral cuando el polipéptido de unión a objetivo se une a su antígeno tumoral correspondiente.
- En un aspecto adicional la invención proporciona una célula inmune que comprende el CAR de la reivindicación 13 o la reivindicación 14 para su uso en el tratamiento de cáncer, opcionalmente en donde la célula inmune es una célula T o una célula asesina natural (NK).
- 25 Los aspectos adicionales de la invención proporcionan un polipéptido de dominio de unión de novo (DBDpp) que comprende tres hélices alfa anti-paralelas unidas por péptidos conectores, en donde (a) el DBDpp es un péptido sintético derivado de modificaciones a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, en donde las modificaciones consisten en 1 a 30 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras seleccionadas de las posiciones 1-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20-27, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43-52, 54, 55, 57-59, 61, 62, 64-66 y 68-73 de la SEQ ID NO:1; (b) el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés, en donde la unión específica del DBDpp al objetivo de interés es mayor que la unión de un polipéptido de referencia que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 a la diana de interés; y (c) el DBDpp no comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:50 o una proteína de fusión que comprende un primer y un segundo DBDpp de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18-21 en donde el primer y el segundo DBDpp exhibe especificidad de unión por un objetivo tumoral, opcionalmente en donde el primer y el segundo DBDpp exhibe especificidad de unión por diferentes objetivos tumorales. Aspectos adicionales de la invención proporcionan una composición farmacéutica que comprende el DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, 23 y 24, o la proteína de fusión de una cualquiera de las
- 30 reivindicaciones 22 a 24 y que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable o un equipo que comprende el DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, 23 y 24, o la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24.
- Aún aspectos adicionales de la invención proporcionan una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18-21, o la proteína de fusión de la reivindicación 22 o un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 27 y opcionalmente además que comprende una secuencia de nucleótidos que regula la expresión del DBDpp, o la proteína de fusión codificada por la molécula de ácido nucleico o una célula hospedera que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 27 o el vector de la reivindicación 28 o una línea celular que comprende el DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18-21, o la proteína de fusión de la reivindicación 22.
- 45 Un aspecto adicional de la invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende (a) un dominio de direccionamiento, (b) un dominio transmembrana y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el dominio de direccionamiento comprende el DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18-21 o la proteína de fusión de la reivindicación 22.
- La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia que codifica el CAR de la reivindicación 31 o la reivindicación 32 o una célula que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el CAR de la reivindicación 31 o la reivindicación 32, opcionalmente en donde la célula es una célula T o una célula asesina natural (NK) y opcionalmente en donde la célula exhibe una inmunidad antitumoral cuando el DBDpp o la proteína de fusión se une a su correspondiente antígeno tumoral o una célula inmune que comprende el CAR de la reivindicación 31 o la reivindicación 32 para su uso en el tratamiento de cáncer, opcionalmente en donde la célula inmune es una célula T o una célula asesina natural (NK) o una célula T que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) para su uso en el tratamiento de cáncer, en donde el CAR comprende:
- 50 (a) un dominio de unión a objetivo que comprende un polipéptido de unión a objetivo que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de
- 65

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQ

X₄₄YKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGN
PEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNP
EVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃
YKGKGNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5), and

- 5 MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇
FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKGKGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6), en donde X_n es un
aminoácido natural o no natural, en donde X_n no es un residuo de cisteína o uno de prolina, en donde el polipéptido
de unión a objetivo se une específicamente a un objetivo de interés expresado por una célula cancerosa y en
10 donde la unión específica del polipéptido de unión a objetivo al objetivo de interés es mayor que la unión de un
polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 al objetivo de interés,
(b) un dominio transmembrana seleccionado de 41BB y CD28 y
(c) un dominio intracelular, en donde el dominio intracelular comprende un dominio de señalización seleccionado
de una cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T.
- 15 Un aspecto adicional de la invención proporciona Un método para transformar un polipéptido de referencia en un
polipéptido de unión a objetivo capaz de unirse específicamente a un objetivo de interés, comprendiendo el método:
(a) modificar una pluralidad de residuos de aminoácidos del polipéptido de referencia para generar una pluralidad
de polipéptidos de unión a objetivo candidatos; en donde los polipéptidos de unión a objetivo candidatos
20 comprenden una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, en donde los polipéptidos de unión
a objetivo candidatos comprenden tres hélices alfa anti-paralelas unidas por péptidos conectores, en donde los
residuos de aminoácidos modificados son accesibles para solventes o inaccesibles para solventes y en donde la
modificación comprende una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras y no incluye
una sustitución con una cisteína o una prolina;
25 (b) empaquetar la pluralidad de polipéptidos de unión a objetivo candidatos en una pluralidad de vectores para generar
una colección de candidatos; y
(c) examinar la colección de candidatos por polipéptidos de unión a objetivo candidatos que exhiben una unión
específica al objetivo de interés;
en donde los polipéptidos de unión a objetivo candidatos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada
30 del grupo que consiste de

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKG
KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGNPEVE
ALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVE
X₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYK GK
GNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YK G
KGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NP
EVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:7),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEALX₅₂
X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:8),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAAFEKEIAAFESLQAYZ₂NPEVEX₅₀LR
X₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:9),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPE
VEX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10) o

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂ YZ₂NP
EVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11), en donde X_n es un aminoácido natural o no natural y Z₁ y
5 Z₂ comprenden entre 2 y 30 aminoácidos naturales o no naturales.

Un aspecto final de la invención proporciona partículas similares a virus (VLP, por sus siglas en inglés) que
comprenden un polipéptido de fusión que comprende el DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18-21, en
donde las VLP son adecuadas para su uso como inmunógenos para la generación de anticuerpos, en donde dichos
anticuerpos se dirigen contra el DBDpp.

10 El alcance de la invención se define por las reivindicaciones. La materia objeto fuera del alcance de las reivindicaciones
se proporciona para información.

En varios ejemplos, el polipéptido tiene una secuencia que difiere de la SEQ ID NO:1 debido a que ciertas posiciones
de aminoácidos seleccionadas han sido modificadas. En algunas modalidades, las modificaciones comprenden
15 sustituciones. En varios ejemplos, las sustituciones son sustituciones conservadoras, mientras que en algunas
modalidades, las sustituciones son sustituciones no conservadoras. En ejemplos aún adicionales, se utilizan
combinaciones de sustituciones conservadoras y no conservadoras. En algunos ejemplos, las sustituciones no
incluyen la sustitución por una cisteína (por ejemplo, no se agregan cisteínas a la secuencia). En algunos ejemplos,
en donde las sustituciones no incluyen la sustitución por una prolina (por ejemplo, no se agregan prolinas a la
20 secuencia). En algunos ejemplos, ni cisteína ni prolina son sustituidas en la secuencia del polipéptido.

Varios objetivos de interés pueden ser unidos por los agentes dados a conocer en este documento. Por ejemplo, en
varias modalidades, el objetivo de interés unido específicamente por el polipéptido es un antígeno de cáncer. En
algunas modalidades, el antígeno de cáncer unido específicamente por el polipéptido es PD-L1. En varias de estas
25 modalidades, el polipéptido que se une al objetivo comprende o consiste esencialmente de una secuencia de
aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO:41,
SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43 y SEQ ID NO:44. En algunas modalidades, el antígeno de cáncer unido
específicamente por el polipéptido es CD137. En algunas de estas modalidades, el polipéptido comprende o consiste
esencialmente de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:12, SEQ ID
30 NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:19. En algunas
modalidades, el antígeno de cáncer unido específicamente por el polipéptido es CD123. En algunas de estas
modalidades, el polipéptido comprende o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos seleccionada de
las SEQ ID NOS: 92-127. En algunas modalidades, una combinación de antígenos de cáncer se fija como objetivo,
por ejemplo al acoplar o combinar de otra manera varios polipéptidos de unión a objetivos. En algunas modalidades,
35 dos, tres, cuatro o más antígenos de cáncer diferentes se fijan como objetivo. En algunas modalidades, múltiples

polipéptidos de unión a objetivos se utilizan para mejorar la habilidad y/o capacidad para unirse a un objetivo individual (por ejemplo, dímeros, trímeros, etcétera).

2. Se proporciona un método para transformar un polipéptido de referencia en un polipéptido de unión a objetivo que se une específicamente a un objetivo de interés, el método comprende:

- (a) modificar una pluralidad de residuos de aminoácidos del polipéptido de referencia para generar una pluralidad de polipéptidos de unión a objetivo candidatos; en donde los polipéptidos de unión a objetivo candidatos comprenden una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, en donde los polipéptidos de unión a objetivo candidatos comprenden tres hélices alfa anti-paralelas unidas por péptidos conectores, en donde los residuos de aminoácidos modificados son accesibles para solventes o inaccesibles para solventes y en donde la modificación comprende una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras y no incluye una sustitución con una cisteína o una prolina;
- (b) empaquetar la pluralidad de polipéptidos de unión a objetivo candidatos en una pluralidad de vectores para generar una colección de candidatos, y
- (c) examinar la colección de candidatos por polipéptidos de unión a objetivo candidatos que exhiben una unión específica al objetivo de interés;

en donde los polipéptidos de unión a objetivo candidatos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKG
KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGNPEVE
ALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVE
X₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGK
GNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKG
KGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NP
EVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:7),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEALX₅₂
X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:8),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAAFEKEIAAFESSELQAYZ₂NPEVEX₅₀LR
X₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:9),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPE
 VEX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10) o

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂ YZ₂NP
 EVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11), en donde X_n es un aminoácido natural o no natural y Z₁ y Z₂ comprenden entre 2 y 30 aminoácidos naturales o no naturales.

En varias modalidades, el método comprende además identificar residuos de aminoácidos potencialmente inmunógenos en los polipéptidos de unión candidatos y modificar por lo menos uno de los residuos de aminoácidos potencialmente inmunógenos (por ejemplo, para reducir la inmunogenicidad potencial de los polipéptidos resultantes que se unen a un objetivo de interés). En varias modalidades, la modificación para reducir la inmunogenicidad comprende una sustitución de aminoácido (por ejemplo, sustituciones conservadoras y/o no conservadoras).

Se proporciona un polipéptido de dominio de unión de novo (DBDpp) que comprende tres hélices alfa anti-paralelas unidas por péptidos conectores, en donde

- (a) el DBDpp es un péptido sintético derivado de modificaciones a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, en donde las modificaciones consisten en 1 a 30 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras seleccionadas de las posiciones 1-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20-27, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43-52, 54, 55, 57-59, 61, 62, 64-66 y 68-73 de la SEQ ID NO:1;
- (b) el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés, en donde la unión específica del DBDpp al objetivo de interés es mayor que la unión de un polipéptido de referencia que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 a la diana de interés; y
- (c) el DBDpp no comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:50.

En varias modalidades, se proporciona un polipéptido de dominio de unión de novo (DBDpp) que comprende o consiste esencialmente de tres hélices alfa anti-paralelas, el DBDpp es una variante de un polipéptido sintético, en donde el DBDpp se une inmuno-específicamente a una proteína que es por lo menos 95% idéntica a CD123. En varias modalidades, el DBDpp tiene una constante de disociación (KD, por sus siglas en inglés) entre aproximadamente 10⁻⁴ M y aproximadamente 10⁻¹² M. En algunas modalidades, el objetivo al cual el DBDpp se une inmuno-específicamente comprende los aminoácidos 19-305 de CD123 (SEQ ID NO:187). También se proporciona en este documento un DBDpp que tiene una secuencia de aminoácidos MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESLQAYKGKGNPEVE X₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4), y en donde X_n es un aminoácido natural o no natural. Por otra parte, también se proporciona un DBDpp que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:60 - SEQ ID NO:136. Las modalidades aún adicionales proporcionan una proteína de fusión que se une a CD123 (u otro objetivo de interés dado a conocer en este documento) y comprende además uno o más de DBDpp adicionales que exhiben especificidad de unión para un objetivo de tumor.

En varias modalidades, el agente de unión a objetivos (por ejemplo, un polipéptido con especificidad por un objetivo de interés) se etiqueta. Dependiendo de la modalidad, se pueden utilizar varias etiquetas, que incluyen pero no están limitadas a una etiqueta enzimática, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente y una etiqueta bioluminiscente. En algunas modalidades, la etiqueta es una porción de biotina. En varias modalidades, se puede utilizar una porción de estreptavidina. En algunas modalidades, se utiliza una marca de His, marca FLAG u otra marca. En algunas modalidades, la etiqueta es luciferasa, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja u otro agente similar.

En varias modalidades, el agente de unión a objetivos (por ejemplo, un polipéptido) se conjuga con un agente terapéutico o citotóxico (por ejemplo, agente quimioterapéutico, agente radioterapéutico, etcétera). Dependiendo de la modalidad, el agente de unión a objetivos puede comprender opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

En varias modalidades, se proporcionan equipos que comprenden cualquiera de los agentes de unión a objetivos dados a conocer en este documento (por ejemplo, un equipo terapéutico, un equipo de diagnóstico, un equipo para el uso en la investigación, etcétera).

Varias modalidades también proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican cualquiera de los polipéptidos de unión a objetivos dados a conocer en este documento. Las modalidades aún adicionales proporcionan un vector (por ejemplo, un plásmido, vector viral, o vector no viral) que contiene la molécula de ácido nucleico aislada. Varias de estas modalidades también pueden incluir componentes estándar para la expresión de una proteína codificada por el ácido nucleico (por ejemplo, promotores, componentes de empaque, etcétera). Por ejemplo, en varias modalidades, el vector comprende además una secuencia de nucleótidos adicional la cual regula la expresión del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico. En varias modalidades, la secuencia de ácido nucleico adicional es un promotor inducible.

En varias modalidades se proporcionan además células hospedantes que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de los polipéptidos de unión a objetivos dados a conocer en este documento. En varias de estas modalidades, la célula hospedante (por ejemplo, una línea de células) se diseña para expresar los polipéptidos de unión a objetivos dados a conocer en este documento. En algunas modalidades, la expresión de los polipéptidos de unión a objetivos por las células hospedantes permite la producción y aislamiento de los polipéptidos de unión a objetivos. En algunas modalidades, la expresión da por resultado los polipéptidos de unión a objetivos expresados sobre la superficie y/o integrales para la membrana de las células.

También se proporcionan en este documento polipéptidos de dominio de unión de novo (DBDpp) que compiten con los polipéptidos dados a conocer en este documento por la unión a CD123 (u otros objetivos de interés). En varias modalidades, también se proporcionan polipéptidos que compiten con aquellos dados a conocer en este documento para la unión a otros objetivos de interés, que incluyen CD123, PD-L1, CD19, CD22 y similares (u otros objetivos dados a conocer en este documento). Los competidores que se proporcionan incluyen agonistas completos o parciales, antagonistas completos o parciales, y similares. Aquellos agentes que compiten por la unión a un objetivo de interés (ya sea al mismo epítipo, un epítipo imbricado u otro epítipo no imbricado que conduce a obstáculos estéricos u otros obstáculos para el agente que se une a un objetivo de interés) se pueden identificar por medio de ensayos de unión competitiva.

En este documento también se proporcionan polipéptidos (ya sea solos o expresados por una célula) que se unen a un tumor. En varias modalidades, la unión se basa en el polipéptido que ha sido generado e identificado como que tiene unión específica para uno o más marcadores expresados por el tumor. El tumor, dependiendo de la modalidad, puede ser un tumor en suspensión o un tumor sólido.

Varias modalidades también proporcionan un receptor antigénico quimérico (CAR, por sus siglas en inglés), en donde el CAR incluye un dominio de fijación como objetivo, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En varias modalidades, el dominio de fijación como objetivo está constituido de, por lo menos en parte, un polipéptido de unión a objetivos como se da a conocer en este documento. En varias modalidades, el dominio de señalización intracelular se selecciona del grupo que consiste de un dominio zeta de CD3 de humano, dominio 41BB, un dominio de CD28 y cualquier combinación de los mismos. Dependiendo de la modalidad, la región de señalización co-estimulante comprende el dominio intracelular de una molécula co-estimulante seleccionada del grupo que consiste de CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, antígeno asociado con la función de linfocitos-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83, y cualquier combinación de los mismos. En varias modalidades, un CAR comprende una proteína de fusión que incluye un polipéptido de unión a objetivos adicional. También se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican CARs que incluyen los polipéptidos de unión a objetivos como parte (o la totalidad) de la región de fijación como objetivo.

En este documento se proporcionan además células que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión a antígenos constituido de, por lo menos en parte, un polipéptido que se une a un objetivo de interés, un dominio transmembrana y un dominio de señalización. En varias modalidades, el polipéptido se une específicamente a un antígeno tumoral (y de esta manera funciona para suministrar la célula que expresa el CAR al tumor. En varias modalidades, el antígeno tumoral está asociado con una malignidad hematológica. En modalidades adicionales, el antígeno tumoral está asociado con un tumor sólido. Los tumores tanto sólidos como hematológicos pueden ser fijados como objetivo simultáneamente en algunas modalidades. En varias modalidades, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste de CD137, PD-L1, CD123, CTLA4, CD47, KIR, DR5, TIM3, PD1, EGFR, TCR, CD19, CD20, CD22, ROR 1, mesotelina, CD33/1L3Ra, cMet, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD2, NY-ESO-1, MAGE A3, y combinaciones de los mismos. Dependiendo de la modalidad, la célula que expresa el CAR puede ser una célula T o una célula asesina natural (NK, por sus siglas en inglés). En varias modalidades, la célula (ya sea una célula T, célula NK u otro tipo de célula) exhibe una inmunidad anti-tumoral cuando el polipéptido se une a su antígeno tumoral correspondiente.

Las modalidades aún adicionales proporcionan aminoácidos que tienen la secuencia de la SEQ ID NO:4, en donde X_n no es cisteína o prolina.

En varias modalidades también se proporcionan células de mamífero que generan partículas similares a virus unidas a la membrana (VLPs, por sus siglas en inglés), en donde la célula de mamífero se diseña para expresar una proteína de fusión que comprende un polipéptido de dominio de unión de novo (DBDpp) fusionado a un receptor antigénico quimérico (CAR), la proteína de fusión es expresada sobre las VLPs generadas (por ejemplo, como proteínas transmembrana). Dependiendo de las modalidades, las VLPs producidas por las células de mamíferos son adecuadas para el uso como inmunógenos para la generación de anticuerpos. En algunas de estas modalidades, los anticuerpos se dirigen contra el polipéptido de dominio de unión de novo (DBDpp) (por ejemplo, los anticuerpos se unen al DBDpp y se pueden utilizar para detectar el DBDpp, aislar el DBDpp, etcétera).

Los polipéptidos de unión a objetivos dados a conocer en este documento también son útiles en un contexto terapéutico, por ejemplo, para el tratamiento y/o diagnóstico de una enfermedad, tal como un cáncer (por ejemplo, una malignidad sólida o hematológica). De esta manera, en varias modalidades se proporcionan métodos para tratar a un

sujeto que tiene cáncer, que comprenden administrar al sujeto una célula inmune que comprende un receptor antigénico quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a objetivos, en donde el dominio de unión a objetivos comprende una polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende: MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AlX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAE_{LA}AFEKEIAAFES_{EL}QAYKGKGNPEVE

5 X₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4), un dominio transmembrana, y un dominio intracelular (que comprende un dominio de señalización). Tras la administración a un sujeto que tiene cáncer, el dominio de unión a objetivos se une específicamente a un objetivo de interés expresado por una célula cancerosa, y la unión del objetivo de interés causa que la célula inmune genere señales citotóxicas que dan por resultado efectos citotóxicos sobre la célula cancerosa, para tratar en consecuencia el cáncer. En varias modalidades, el polipéptido tiene una secuencia
10 que difiere de la SEQ ID NO:1 (por ejemplo, el polipéptido se genera al modificar la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1). Como resultado de la secuencia diferente, la unión específica del polipéptido al objetivo de interés es mayor que la unión de un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 al objetivo de interés.

Dependiendo del ejemplo, la célula inmune puede ser una célula T. En algunas modalidades, la célula inmune es una
15 célula NK. Otras células inmunes y/o combinaciones de diferentes tipos de células inmunes se pueden utilizar opcionalmente. En algunos ejemplos, las combinaciones de tipos de células (por ejemplo, células NK y células T) son ventajosas debido a que actúan de manera sinérgica para tratar un cáncer. Cuando se utilizan combinaciones, los diversos tipos de células pueden fijar como objetivo los mismos o diferentes antígenos tumorales (o indicados).

En varios ejemplos en donde se utilizan células T, la unión del objetivo de interés estimula la célula T para iniciar la señalización intracelular, producir citocinas y desgranularse, lo que conduce a efectos citotóxicos sobre la célula cancerosa. Adicionalmente, en varias modalidades, la célula T prolifera en respuesta a la unión del objetivo de interés. Ventajosamente, sin embargo, la actividad de la célula T no da por resultado las células T que exhiben un fenotipo asociado con el agotamiento de células T. En varios ejemplos donde se utilizan células T, el dominio transmembrana
20 del CAR comprende 41BB o CD28, y el dominio citoplasmático comprende una cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T.

En varios ejemplos donde se utilizan células NK, el dominio transmembrana comprende CD28, y el dominio citoplasmático comprende una cadena zeta del receptor de células T.

En varios ejemplos, las células inmunes que contienen CAR se diseñan para unirse a un objetivo de interés expresado por la célula cancerosa, tal como un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste de CD137, PD-L1, CD123, CTLA4, CD47, KIR, DR5, TIM3, PD1, EGFR, TCR, CD19, CD20, CD22, ROR 1, mesotelina, CD33/IL3Ra, cMet, PSMA, glicolípidio F77, EGFRvIII, GD2, NY-ESO-1, MAGE A3, y combinaciones de los mismos.

En varios ejemplos, el CAR comprende además un segundo polipéptido que tiene un aminoácido de la SEQ ID NO:4, el polipéptido es capaz de unirse específicamente a un segundo objetivo de interés expresado por una célula cancerosa, y en donde la unión específica del segundo polipéptido al segundo objetivo de interés es mayor que la unión de un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 al segundo objetivo de interés. En varias modalidades, la
35 generación del polipéptido que constituye por lo menos una porción del dominio de fijación como objetivo del CAR no incluye sustituir una cisteína o una prolina en la SEQ ID NO:1.

En varios ejemplos, la administración de las células inmunes con un CAR es intravenosa, aunque se pueden utilizar otras rutas, tales como intra-arterial, intramuscular, local, u otra ruta aceptable para un escenario de tratamiento
40 determinado.

También se describen, en varios ejemplos, métodos de tratamiento de un sujeto que tiene cáncer, que comprenden, administrar al sujeto una célula inmune que comprende un receptor antigénico quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión a objetivos, en donde el dominio de unión a objetivos comprende un polipéptido que
50 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, en donde ningún residuo de cisteína o prolina es sustituido en alguna de las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, en donde el polipéptido se une específicamente a un objetivo de interés expresado por una célula cancerosa, y en donde la unión específica del polipéptido a un objetivo de interés es mayor que la unión de un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 al objetivo de interés, un dominio transmembrana
55 y un dominio intracelular, en donde el dominio intracelular comprende un dominio de señalización, en donde, tras la administración a un sujeto que tiene cáncer, el dominio de unión a objetivos se une específicamente al objetivo de interés expresado por una célula cancerosa, y en donde la unión del objetivo de interés causa que la célula inmune genere señales citotóxicas que dan por resultado efectos citotóxicos sobre la célula cancerosa, para tratar en consecuencia el cáncer. Como se planteara anteriormente, dependiendo del ejemplo, la célula inmune puede ser una
60 célula T, una célula NK u otro tipo de célula inmune (o combinaciones de varios tipos). En una modalidad, el dominio transmembrana comprende 41BB o CD28, en donde el dominio citoplasmático comprende una cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, y en donde la célula inmune es una célula T. En algunos de estos ejemplos, tras la unión del objetivo de interés, la célula T se estimula para que inicie la señalización intracelular, produzca citocinas, prolifere y se desgranule, lo que conduce a los efectos citotóxicos sobre la célula cancerosa, sin que las células T exhiban un fenotipo asociado con el agotamiento de células T.
65

Los ejemplos descritos adicionales proporcionan un método de tratamiento de un sujeto que tiene cáncer, el método comprende administrar por vía intravenosa al sujeto una célula inmune que comprende un receptor antigénico quimérico (CAR) expresado en una célula T, en donde el CAR comprende un dominio de unión a objetivos que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende, el polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6, sin embargo, ningún residuo de cisteína o prolina es sustituido en ninguna de las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6, el polipéptido capaz de unirse específicamente a un objetivo de interés expresado por una célula cancerosa con una unión al objetivo de interés que es mayor que la unión de un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 al objetivo de interés, un dominio transmembrana seleccionado de 41BB y CD28, y un dominio intracelular, en donde el dominio intracelular comprende un dominio de señalización seleccionado de una cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, en donde, tras la administración a un sujeto que tiene cáncer, el dominio de unión a objetivos se une específicamente al objetivo de interés expresado por una célula cancerosa, y en donde la unión del objetivo de interés causa que la célula T genere señales citotóxicas que dan por resultado efectos citotóxicos sobre la célula cancerosa. En varios ejemplos, los efectos citotóxicos resultan de la desgranulación de las células T. Ventajosamente, en varios ejemplos, la activación y la actividad citotóxica de las células T no está asociada con las células T que exhiben un fenotipo asociado con el agotamiento de células T. En varias modalidades, el CAR comprende opcionalmente además un segundo dominio de unión a objetivos que comprende un segundo polipéptido que tiene un objetivo diferente del dominio de unión a objetivos. En ejemplos aún adicionales, los dominios de fijación como objetivo adicionales se pueden incluir opcionalmente para mejorar la capacidad de unión a un marcador, o conferir especificidad de unión a otros marcadores.

En varios ejemplos se proporciona adicionalmente el uso de una célula inmune que comprende un receptor antigénico quimérico (CAR) para el tratamiento del cáncer, en donde el CAR comprende un dominio de unión a objetivos que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende, el polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, en donde ningún residuo de cisteína o prolina es sustituido en ninguna de las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, en donde el polipéptido se une específicamente a un objetivo de interés expresado por una célula cancerosa, y en donde la unión específica del polipéptido al objetivo de interés es mayor que la unión de un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 al objetivo de interés, un dominio transmembrana seleccionado de 41BB y CD28, y un dominio intracelular, en donde el dominio intracelular comprende un dominio de señalización seleccionado de una cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, en donde, tras la administración a un sujeto que tiene cáncer, el dominio de unión a objetivos se une específicamente al objetivo de interés expresado por una célula cancerosa, y en donde la unión del objetivo de interés causa que la célula inmune genere señales citotóxicas que dan por resultado efectos citotóxicos sobre la célula cancerosa. Dependiendo del ejemplo, las células inmunes pueden ser una célula T o una célula asesina natural (NK).

Además de composiciones de dominios de unión, métodos para generar, examinar y utilizar las mismas, también se describen métodos para purificar objetivos de interés. De esta manera, en este documento se describe un método para purificar un objetivo de interés que comprende poner en contacto una muestra que comprende un objetivo de interés con una composición que comprende un agente de polipéptido adherido a un soporte sólido, en donde el agente de polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESQLQAYKKGKNPEVE X₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4), en donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO:1, en donde el polipéptido se une específicamente al objetivo de interés, en donde la unión específica del polipéptido al objetivo de interés es mayor que la unión de un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 al objetivo de interés, el contacto se realiza bajo condiciones que permiten la unión de la composición al objetivo de interés, y retirar una porción de la muestra que no está unida a la composición. En varios ejemplos el método comprende además disociar la composición del objetivo de interés y recuperar el objetivo de interés. En varios ejemplos, el objetivo de interés puede ser eluido de la composición, para purificar en consecuencia (completa o parcialmente) el objetivo de interés.

Dependiendo del ejemplo, el soporte sólido puede ser una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina o una agarosa. Las combinaciones de soportes se pueden utilizar en ciertas modalidades. En varias modalidades, el agente de polipéptido se acopla al soporte sólido a través de una asociación no covalente, mientras que en otros ejemplos, el agente de polipéptido se acopla al soporte sólido a través de la unión covalente. Dependiendo de la modalidad, también se pueden utilizar las combinaciones de soportes, y el objetivo de interés, de asociación covalente y no covalente.

En varios ejemplos, el agente de polipéptido de la composición comprende además una marca de péptido, en donde la marca de péptido comprende una porción de hexahistidina o una marca FLAG. En algunos ejemplos, el agente de polipéptido de la composición comprende además una porción de estreptavidina. Otros tipos de marcas, por ejemplo, enzimas, marcas colorimétricas, bioluminiscentes y/o fluorescentes se pueden utilizar, dependiendo del ejemplo.

En algunos ejemplos, el soporte sólido comprende una cuenta, y la composición es adecuada para el uso en la cromatografía de afinidad para purificar el objetivo de interés.

En varios ejemplos, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido se empaca en un vector de expresión

que se utiliza para transducir una línea de células para causar que la línea de células exprese el polipéptido. Estos ejemplos permiten la producción del polipéptido a una escala mayor para el uso en la purificación de proteínas.

También se describe un método para purificar un objetivo de interés que comprende poner en contacto una muestra que comprende un objetivo de interés con una composición que comprende una partícula similar a un virus acoplada a un soporte sólido, en donde la partícula similar a un virus expresa una polipéptido como una proteína de membrana, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5 y SEC ID NO:6, en donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO:1, en donde el polipéptido se une específicamente al objetivo de interés, en donde la unión específica del polipéptido al objetivo de interés es mayor que la unión de un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 al objetivo de interés; y el contacto se realiza bajo condiciones que permiten la unión de la composición al objetivo de interés; y retirar una porción de la muestra que no está unida a la composición. En varias modalidades, en donde ningún residuo de cisteína o prolina es sustituido en ninguna de las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6 cuando se genera el polipéptido.

En varios ejemplos, el soporte sólido comprende uno o más de una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina o una agarosa. En varios ejemplos, el polipéptido de la composición comprende además una marca de péptido, en donde la marca de péptido comprende una porción de hexahistidina o una marca FLAG. Como se planteara en este documento, otros tipos de marcas se pueden utilizar en ejemplos adicionales.

En algunos ejemplos, la porción de la muestra que no se une a la composición se desecha. En algunas modalidades, la porción de la muestra que no se une a la composición se pone en contacto con la composición una segunda ocasión para capturar objetivo de interés adicional, mejorando en consecuencia el rendimiento total de la purificación.

En varios ejemplos, el método comprende además poner en contacto la porción de la muestra que no se une a la composición con un anticuerpo dirigido contra el polipéptido de la composición, el anticuerpo que es generado a partir de partículas similares a virus unidas a la membrana (VLP) que expresan el polipéptido liberado de una célula de mamífero se diseña para expresar una proteína de fusión que comprende el polipéptido fusionado a un receptor antigénico quimérico (CAR), y la proteína de fusión es expresada en las VLPs generadas, en donde los anticuerpos son adecuados para el uso en un ensayo para detectar polipéptidos residuales separados del soporte sólido.

No solo se describen métodos para purificar un objetivo (por ejemplo, remoción del objetivo de una muestra más grande), sino que varios ejemplos descritos proporcionan un método para retirar uno o más contaminantes de una muestra que comprende un objetivo de interés, el método comprende poner en contacto una muestra que comprende un objetivo de interés con una composición que comprende una partícula similar a un virus acoplada a un soporte sólido, en donde la partícula similar a un virus expresa un polipéptido como una proteína de la membrana, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, en donde ningún residuo de cisteína o prolina es sustituido en ninguna de las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, en donde el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO:1, en donde el polipéptido se une específicamente a uno o más contaminantes a ser retirados de una muestra que comprende el objetivo de interés, en donde la unión específica del polipéptido a uno o más contaminantes es mayor que la unión de un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 a uno o más de los contaminantes; el contacto se realiza bajo condiciones que permiten la unión de la composición a uno o más de los contaminantes; y recolectar una porción de la muestra que no se une a la composición. Como se planteó anteriormente, en varios ejemplos, el polipéptido de la composición comprende además una marca, tal como una marca de péptido. En varios ejemplos, la marca de péptido comprende una porción de hexahistidina o una marca FLAG. Dependiendo de los ejemplos, el soporte sólido puede comprender una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina o una agarosa y las partículas similares a virus se acoplan al soporte sólido a través de una asociación no covalente. En algunos ejemplos, la porción de la muestra que es recolectada se pone en contacto con la composición una segunda ocasión para retirar contaminantes adicionales de la muestra.

También se describen composiciones para el uso en la purificación de proteínas. En varios ejemplos, se proporciona una resina de afinidad que comprende un agente de polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de:

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKG
KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGNPEVE
ALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVE
X₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGK
GNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKG
KGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPE
VEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:7),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEALX₅₂
X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:8),
MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAAFEKEIAAFESSELQAYZ₂NPEVEX₅₀LRX₅₃
X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:9),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEV
EX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10) y

- 5 MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NP
EVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11), así como también combinaciones de las mismas, y en
donde la secuencia de aminoácidos no es la SEQ ID NO:1.

- 10 En cualquiera de las secuencias listadas anteriormente, cualquiera de las posiciones X (por ejemplo, "X_n") puede ser
un aminoácido natural o no natural; en donde cada X_n es el mismo o diferente aminoácido natural o no natural.
Adicionalmente, en varios ejemplos, Z₁ y/o Z₂ pueden comprender entre aproximadamente 2 a aproximadamente 30
aminoácidos naturales o no naturales.

- 15 En varios ejemplos, el agente de polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO:1 por
una sustitución de aminoácido en uno o más residuos. Dependiendo de las modalidades, la sustitución de aminoácido
en uno o más residuos puede comprender una sustitución conservadora, o una sustitución no conservadora. Las
combinaciones de sustituciones conservadoras y no conservadoras también se pueden utilizar, en varias modalidades.
Adicionalmente, en varios ejemplos, la sustitución de aminoácido en uno o más residuos comprende una sustitución
20 en un residuo accesible para solventes. En algunos ejemplos, la sustitución de aminoácido en uno o más residuos
comprende una sustitución en un residuo inaccesible para solventes. En algunos ejemplos, las sustituciones (ya sea
conservadoras o no conservadoras) se pueden hacer opcionalmente en residuos tanto accesibles para solventes como
inaccesibles para solventes. En varias modalidades, el agente de polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que
difiere de la SEQ ID NO:1 por una supresión de aminoácido en uno o más residuos.

En varios ejemplos descritos, se proporciona un método de hacer una resina de afinidad que comprende adherir a un soporte sólido un agente de polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de:

5 MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKG
KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGNPEVE
ALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVE
X₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGK
GNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKG
KGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPE
VEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:7),
MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEALX₅₂
X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:8),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAAFEKEIAAFESSELQAYZ₂NPEVEX₅₀LRX₅₃
X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:9),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEV
EX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10) y

10 MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPE
VEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11), y combinaciones de las mismas, en donde la secuencia de
15 aminoácidos no es la SEQ ID NO:1. En varios ejemplos, las posiciones X de las secuencias (por ejemplo, "X_n") pueden
comprender un aminoácido natural o no natural; en donde cada X_n es el mismo o diferente aminoácido natural o no
natural; y/o en donde Z₁ y/o Z₂ es de 2 a 30 aminoácidos naturales o no naturales. En varias modalidades, el agente
de polipéptido se adhiere al soporte sólido por medio de la unión covalente, por medio de la asociación no covalente,
o combinaciones de las mismas. En varias modalidades, el soporte sólido comprende uno o más de una cuenta,
portaobjetos, chip, gelatina o agarosa.

20 Para la purificación de proteínas se describe además, en varios ejemplos, una composición que comprende un soporte
sólido acoplado a un agente de polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia
seleccionada del grupo que consiste de

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKG
KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGNPEVE
ALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVE
X₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGK
GNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKG
KGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPE
VEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:7),
MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEALX₅₂
X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:8),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAAFEKEIAAFESSELQAYZ₂NPEVEX₅₀LRX₅₃
X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:9),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEV
EX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10) y

5 MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPE
VEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11), y combinaciones de las mismas, en donde la secuencia de
aminoácidos no es la SEQ ID NO:1. En varios ejemplos, X_n es un aminoácido natural o no natural; en donde cada X_n
es el mismo o diferente aminoácido natural o no natural; y/o Z₁ y/o Z₂ es de 2 a 30 aminoácidos naturales o no naturales.
En varios ejemplos, el agente de polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO:1 por
una sustitución de aminoácido en uno o más residuos.

10 Dependiendo del ejemplo, la sustitución de aminoácido en uno o más residuos puede comprender una sustitución
conservadora o puede comprender una sustitución no conservadora. Las combinaciones de sustituciones
conservadoras y no conservadoras también se pueden utilizar, en ciertas modalidades. En varios ejemplos, la
sustitución de aminoácido en uno o más residuos comprende una sustitución en un residuo accesible para solventes.
15 En varios ejemplos, la sustitución de aminoácido en uno o más residuos comprende una sustitución en un residuo
inaccesible para solventes. Algunas modalidades emplean sustituciones en residuos tanto accesibles como
inaccesibles para solventes. En varios ejemplos, el agente de polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que
difiere de la SEQ ID NO:1 por la supresión de aminoácido en uno o más residuos. Dependiendo de los ejemplos, el
soporte sólido puede comprender uno o más de una cuenta, portaobjetos, chip, gelatina o agarosa.

20 En varios ejemplos, los polipéptidos dados a conocer en este documento se pueden utilizar en analítica de proteínas,
tal como una función como agentes o marcas detectables. Como tal, se proporciona en este documento, en varias

modalidades, una composición que comprende un agente de polipéptido conjugado con un agente y/o marca detectable, en donde el agente de polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de:

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKG
KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGNPEVE
ALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVE
X₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGK
GNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKG
KGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6),
MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPE
VEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:7),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEALX₅₂
X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:8),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAAFEKEIAAFESSELQAYZ₂NPEVEX₅₀LRX₅₃
X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:9),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEV
EX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10) y

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPE
VEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11), y combinaciones de las mismas, en donde la secuencia de aminoácidos no es la SEQ ID NO:1. En varios ejemplos, X_n es un aminoácido natural o no natural; en donde cada X_n es el mismo o diferente aminoácido natural o no natural; y/o en donde Z₁ y/o Z₂ es de 2 a 30 aminoácidos naturales o no naturales.

En varios ejemplos, el agente detectable comprende un cromógeno. En varias modalidades, el agente detectable comprende un tinte fluorescente. En varios ejemplos, el agente detectable comprende un radionúclido. En estos ejemplos, el agente detectable es cuantificable.

En varios ejemplos de la composición, el agente de polipéptido se conjuga con una cuenta, resina, portaobjetos, chip, gelatina o agarosa de cromatografía. En varios ejemplos, la marca comprende una marca de polihistidilo, una marca de myc o una marca FLAG. Las combinaciones de marcas también se pueden utilizar en varias modalidades. En varias modalidades, el agente de polipéptido se conjuga con un agente o marca detectable por medio de la unión covalente. En varios ejemplos de la composición, el agente de polipéptido es una proteína de fusión. En varios ejemplos, el

agente de polipéptido es multimérico.

Los polipéptidos (DBDpp) que contienen dominios de unión de novo (DBD) como se definen en la reivindicación 18 que se unen específicamente a objetivos de interés se proporcionan, como son ácidos nucleicos que codifican el DBDpp proporcionado, vectores que contienen los ácidos nucleicos y células hospedantes que contienen los ácidos nucleicos y vectores. Las colecciones de DBDpp, los métodos para producir y examinar estas colecciones y los DBDpp identificados originalmente como un ejercicio en el plegamiento de proteínas (véase, Walsh y colaboradores, PNAS 96:5486-5491 (1999)). Se ha descubierto, y se da a conocer en este documento en varios ejemplos, que los polipéptidos que contienen modificaciones del andamiaje de referencia sin objetivo que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 tienen la capacidad de unirse específicamente a objetivos de interés. Sin desear ser limitado a teoría alguna, se cree que en el diseño del DBD, las restricciones estructurales de los residuos expuestos en la superficie (que pueden ser modificados) confieren la capacidad de los residuos expuestos en la superficie para unirse específicamente a un objetivo de interés.

En un ejemplo, se proporciona un DBDpp cuya secuencia de aminoácidos difiere (por ejemplo, debido a modificaciones de aminoácidos) de aquella de un andamiaje de referencia que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:1. El andamiaje de referencia es una variante de un polipéptido de referencia de agrupación de tres hélices anti-paralelas que no es de origen natural y sin objetivo (por ejemplo, para conocimiento del solicitante, sin objetivo se conoce actualmente) diseñado originalmente como un ejercicio en el plegamiento de proteínas (véase, Walsh y colaboradores, PNAS 96:5486-5491 (1999)). Se ha descubierto, y se da a conocer en este documento en varios ejemplos, que los polipéptidos que contienen modificaciones del andamiaje de referencia sin objetivo que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 tienen la capacidad de unirse específicamente a objetivos de interés. Sin desear ser limitado a teoría alguna, se cree que en el diseño del DBD, las restricciones estructurales de los residuos expuestos en la superficie (que pueden ser modificados) confieren la capacidad de los residuos expuestos en la superficie para unirse específicamente a un objetivo de interés.

La invención proporciona un polipéptido de dominio de unión de novo (DBDpp) que comprende tres hélices alfa anti-paralelas unidas por péptidos conectores, en donde (a) el DBDpp es un péptido sintético derivado de modificaciones a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, en donde las modificaciones consisten en 1 a 30 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras seleccionadas de las posiciones 1-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20-27, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43-52, 54, 55, 57-59, 61, 62, 64-66 y 68-73 de la SEQ ID NO:1; (b) el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés, en donde la unión específica del DBDpp al objetivo de interés es mayor que la unión de un polipéptido de referencia que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 a la diana de interés; y (c) el DBDpp no comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:50. De acuerdo con varias modalidades, los agentes de unión a objetivos (por ejemplo, el DBDpp) proporcionados en este documento se unen específicamente a un objetivo de interés (tal como un marcador asociado con el cáncer o un tumor, tal como CD123, CD137, PD-L1, CD19, CD22, NY-ESO, MAGE A3, como modalidades no limitantes). En varias modalidades, un agente de unión a objetivos proporcionado (por ejemplo, un DBDpp) comprende un total de 5 a 25 o de 5 a 30 residuos de aminoácidos que han sido modificados en comparación con la SEQ ID NO:1; y en donde el agente se une específicamente a un objetivo de interés. Los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones. En otra modalidad, de 5 a 25 o de 5 a 30 de los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones conservadoras. En otro ejemplo, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45 o de 5 a 50 de los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones no conservadoras. En una modalidad adicional, de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos son sustituciones conservadoras y de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos son sustituciones no conservadoras. En modalidades adicionales, de 1 a 30 de las sustituciones son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de: M1, G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, L21, G22, G23, S24, E25, A26, E27, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, Y45, K46, G47, K48, G49, N50, P51, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69, Y70, R71, H72 y N73. En una modalidad adicional, de 1 a 20 o de 1 a 30 de las sustituciones son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de: G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69 y Y70. En una modalidad adicional opcional, el DBDpp comprende además opcionalmente una secuencia de aminoácidos en donde de 1 a 5, de 1 a 10, de 1 a 15, de 5 a 10 o de 5 a 15 de los residuos que corresponden a los residuos inaccesibles para solventes de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En varias modalidades, el DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos en donde de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 (o más) de los residuos que corresponden a los residuos accesibles para solventes o los residuos inaccesibles para solventes de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos. En varias modalidades, la sustitución de residuos tanto accesibles como inaccesibles confiere un mayor grado de especificidad por objetivos en comparación con la sustitución de únicamente residuos accesibles o únicamente residuos inaccesibles. En una modalidad opcional adicional, los residuos sustituidos que corresponden a un residuo inaccesible para solventes de la SEQ ID NO:1 se seleccionan del grupo que consiste de: F7, L11, I14, L18, L28, F31, I35, F38, L42, V53, L56, A60, I63 y L67, e Y70. En una modalidad adicional, L21 e Y45 también están incluidos en el grupo de residuos inaccesibles para solventes, sustituidos. En una modalidad adicional, el DBDpp es una proteína de fusión (por ejemplo, el DBDpp se fusiona, se conjuga o se asocia de otra manera con otra molécula, directa o indirectamente, tal como un agente terapéutico o de diagnóstico). En un ejemplo, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En un ejemplo adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina y una agarosa. En una modalidad adicional, el

DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un antígeno específico para tumores (TSA), un antígeno específico para cáncer (CSA) y una proteína que contiene una marca de péptido. En otra modalidad, el DBDpp se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes (que incluyen partículas virales) que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En algunas modalidades, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En modalidades adicionales, la célula hospedante es un procariota o un eucariota que expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es una célula inmune humana que expresa una proteína de fusión de DBDpp sobre su superficie. También se proporcionan colecciones que comprenden una pluralidad de DBDpp.

En una modalidad, un DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de: (a) MGSWX₅EFX₈RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAEALAAFEKE IAAFESELQAYKGKGNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₅₅, X₅₈, X₅₉, X₆₂, X₆₅ y/o X₆₆, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural; (b) MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAEALAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₃₀, X₃₃, X₃₄, X₃₇, X₄₀, X₄₁ y/o X₄₄, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural; (c) MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAEALAA FX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3), en donde X₃₂, X₃₃, X₃₆, X₃₉, X₄₀, X₄₃, X₅₇, X₅₈, X₆₁, X₆₄, X₆₅ y/o X₆₈, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y; (d) MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAEALAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AA X₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₃₂, X₃₃, X₃₆, X₃₉, X₄₀, X₄₃, X₅₅, X₅₈, X₅₉, X₆₂, X₆₅ y/o X₆₆, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural; y (e) MGSWX₅EFX₈RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAEALAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKKGKGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₃₀, X₃₃, X₃₄, X₃₇, X₄₀, X₄₁, X₄₄, X₅₇, X₅₈, X₆₁, X₆₄, X₆₅ y/o X₆₈, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural; y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En varias modalidades, un DBDpp comprende, consiste de o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. En modalidades aún adicionales, X_n es una supresión de un aminoácido (por ejemplo, opcionalmente una posición nula en la secuencia). En una modalidad adicional, el DBDpp es una proteína de fusión. En otra modalidad, el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En una modalidad adicional, se proporciona una colección que contiene una pluralidad de DBDpp. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes (que incluyen partículas virales) que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En algunas modalidades, la célula hospedante es un procariota o un eucariota que expresa el DBDpp sobre su superficie. En algunas modalidades, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es una célula inmune humana (por ejemplo, célula B, célula T, célula asesina natural y similares) que expresa una o más proteínas de fusión de DBDpp sobre su superficie. En una modalidad, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En una modalidad adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, otros materiales basados en vidrio o plástico (por ejemplo, un filtro o un dispositivo de filtro), un material de filtración (por ejemplo, fibra de vidrio, lana de acero, polietersulfona, etcétera), un chip, una gelatina y una agarosa, y combinaciones de los mismos.

También se describe un DBDpp aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de: (a) MGSWX₅EFX₈RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAEALAAFEKEIAAFESELQAYZ₂NPEVEX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:9), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₅₀, X₅₃, X₅₄, X₅₇, X₆₀ y/o X₆₁, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y/o Z₂ es de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; (b) MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAEALAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:7), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₂₈, X₃₁, X₃₂, X₃₅, X₃₈, X₃₉ y/o X₄₂, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y/o Z₂ es de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; (c)

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AY
RHN (SEQ ID NO:8), en donde X₃₀, X₃₁, X₃₄, X₃₇, X₃₈, X₄₁, X₅₂, X₅₃, X₅₆, X₅₉, X₆₀ y/o X₆₃, es un residuo de aminoácido
natural y/o no natural, y Z₁ y/o Z₂ es de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; (d)

MGSWX₅FX₆FKX₉LAX₁₃IKX₁₆X₁₇ LEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇

X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇,
X₃₀, X₃₁, X₃₄, X₃₇, X₃₈, X₄₁, X₅₀, X₅₃, X₅₄, X₅₇, X₆₀ y/o X₆₁, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y/o
Z₂ es de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; y (e)

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPEVEAL

X₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₂₈, X₃₁, X₃₂, X₃₅, X₃₈, X₃₉,
X₄₂ X₅₂, X₅₃, X₅₆, X₅₉, X₆₀ y/o X₆₃, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y/o Z₂ es de 2 a 30 residuos

de aminoácidos naturales y/o no naturales; y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En
varios ejemplos, un DBDpp comprende, consiste de o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos
seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, y SEQ ID
NO:11. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo

de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. En ejemplos aún adicionales, X_n es una supresión de un
aminoácido (por ejemplo, opcionalmente una posición nula en la secuencia). En ejemplos aún adicionales, Z₁ y/o Z₂
son supresiones de aminoácidos (por ejemplo, opcionalmente posiciones nulas en la secuencia). En un ejemplo

adicional, el DBDpp es una proteína de fusión. En otro ejemplo, el DBDpp se une específicamente a un objetivo de
interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un
antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, el DBDpp se une

específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una
hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y
una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, el DBDpp se une específicamente a un

objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, se proporciona una colección que contiene una
pluralidad de DBDpp. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los
ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes, que incluyen partículas virales, que contienen los

ácidos nucleicos. En algunos ejemplos, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo
adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En ejemplos adicionales, la
célula hospedante es una procarionte o una eucarionte que expresa el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo

adicional, la célula hospedante es una célula inmune humana que expresa una proteína de fusión de DBDpp sobre su
superficie. En un ejemplo, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En un ejemplo adicional, el soporte sólido se
selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina y una agarosa.

También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican un DBDpp tal como una proteína de fusión de DBDpp.

Adicionalmente se proporcionan vectores que contienen ácidos nucleicos que codifican el DBDpp (por ejemplo,
proteínas de fusión de DBDpp) y células hospedantes que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En algunos
ejemplos, la célula hospedante es una partícula viral, o una célula bacteriana, de levadura, fúngica o vegetal. En una

modalidad particular, la célula hospedante es una célula de mamífero. En otro ejemplo, la célula de mamífero es una
célula inmune. En un ejemplo adicional, la célula hospedante es una célula inmune humana. En algunas modalidades,
la célula hospedante expresa el DBDpp como una proteína de fusión sobre la superficie celular. En un ejemplo

adicional, la célula hospedante es una célula inmune humana que expresa un DBDpp sobre la superficie celular.
Adicionalmente, en este documento se proporcionan colecciones de vectores que comprenden ácidos nucleicos que
codifican una pluralidad de DBDpp.

También se proporciona una colección que contiene una pluralidad de DBDpp. En un ejemplo, la colección de DBDpp
comprende una pluralidad de DBDpp que contiene una secuencia de aminoácidos diferente y que comprende la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 en donde un total de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45,

de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 residuos de aminoácidos (incluyendo cualquier número entre aquellos listados) han
sido modificados; y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En otro ejemplo, de 5 a 25,
de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 (incluyendo cualquier número entre aquellos

listados) de los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones. En otro ejemplo, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a
35, de 5 a 40, de 5 a 45 o de 5 a 50 (incluyendo cualquier número entre aquellos listados) de los residuos de
aminoácidos modificados son sustituciones conservadoras. En otro ejemplo, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a

40, de 5 a 45, o de 5 a 50 (incluyendo cualquier número entre aquellos listados) de los residuos de aminoácidos
modificados son sustituciones no conservadoras. En una modalidad adicional, de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a
30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 (incluyendo cualquier número entre aquellos listados) de las modificaciones de

residuos de aminoácidos son sustituciones conservadoras y de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de
5 a 40 o de 5 a 45 (incluyendo cualquier número entre aquellos listados) de las modificaciones de residuos de
aminoácidos son sustituciones no conservadoras. En algunos ejemplos, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de

5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 (incluyendo cualquier número entre aquellos listados) de las sustituciones
están en uno o más residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de: M1, G2,
S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, L21, G22, G23, S24, E25, A26, E27, A29, A30,

E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, Y45, K46, G47, K48, G49, N50, P51, E52, E54, A55, E57, K58,
E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69, Y70, R71, H72 y N73. En una modalidad adicional, de 1 a 20, de 1 a 30 o
de 1 a 40 (incluyendo cualquier número entre aquellos listados) de las sustituciones son en uno o más de los residuos

de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de: G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12,

A13, K15, T16, R17, E19, A20, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69 e Y70. En otra modalidad, la colección comprende por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 (incluyendo cualquier intervalo entre aquellos números listados, tal como 2-10, 5-25, 50-100, 250-1000, etcétera) DBDpp diferentes que se unen específicamente a diferentes objetivos (o DBDpp que tienen especificidad diferencial por un objetivo determinado). En una modalidad adicional, los diferentes objetivos unidos por DBDpp en la colección se seleccionan del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, la colección comprende por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 (incluyendo cualquier intervalo entre aquellos números listados, tal como 2-10, 5-25, 50-100, 250-1000, etcétera) DBDpp diferentes que se unen específicamente a un objetivo de proteína seleccionado del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, la colección comprende por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 (incluyendo cualquier intervalo entre aquellos números listados, tal como 2-10, 5-25, 50-100, 250-1000, etcétera) DBDpp diferentes que se unen específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, la colección es una colección de vectores o una colección de células hospedantes. En un ejemplo adicional, la colección de vectores es una colección de células hospedantes. En otro ejemplo, la colección de células hospedantes comprende una pluralidad de células hospedantes que expresan el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, las células hospedantes son fagos que expresan el DBDpp sobre su superficie. En algunos ejemplos, la colección de vectores comprende: (a) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos; (b) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo objetivo; (c) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo epítipo de un objetivo; (d) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente a diferentes epítopos de un objetivo; (e) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que compiten por la unión al mismo objetivo; o (f) 3 diferentes secuencias de ácidos nucleicos que codifican la misma secuencia de DBDpp. También se proporcionan células hospedantes que contienen los vectores.

También se describe una colección de vectores que comprende una pluralidad de diferentes secuencias de ácidos nucleicos que codifican los DBDpp, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 en donde un total de 1 a 5, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 residuos de aminoácidos han sido modificados (o cualquier número entre aquellos listados); y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En otro ejemplo, de 1 a 5, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 de los residuos de aminoácidos modificados (o cualquier número entre aquellos listados) codificados por las secuencias de ácidos nucleicos son sustituciones. En otro ejemplo, de 1 a 5, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, o de 5 a 50 de los residuos de aminoácidos modificados (o cualquier número entre aquellos listados) son sustituciones conservadoras. En otro ejemplo, de 1 a 5, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45 o de 5 a 50 de los residuos de aminoácidos modificados codificados (o cualquier número entre aquellos listados) son sustituciones no conservadoras. En un ejemplo adicional, de 1 a 5, de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos codificados (o cualquier número entre aquellos listados) son sustituciones conservadoras y de 1 a 5, de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos codificados (o cualquier número entre aquellos listados) son sustituciones no conservadoras. En ejemplos adicionales, de 1 a 5, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 de las sustituciones codificadas (o cualquier número entre aquellos listados) son en los residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de uno o más de: M1, G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, L21, G22, G23, S24, E25, A26, E27, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, Y45, K46, G47, K48, G49, N50, P51, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69, Y70, R71, H72 y N73. En un ejemplo adicional, de 1 a 20, de 1 a 30, o de 1 a 40 de las sustituciones codificadas (o cualquier número entre aquellos listados) son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de uno o más de: G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69 e Y70. En un ejemplo adicional, los ácidos nucleicos codifican opcionalmente un DBDpp que comprende además una secuencia de aminoácidos en donde de 1 a 5, de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 (o cualquier número entre aquellos listados) de los residuos que corresponden a los residuos inaccesibles para solventes de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En otro ejemplo, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 DBDpp diferentes que se unen específicamente a diferentes objetivos (o tienen afinidad variada por el mismo objetivo). En un ejemplo adicional, los diferentes objetivos unidos por el DBDpp en la colección se seleccionan del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En una modalidad adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 DBDpp diferentes que se unen específicamente a un objetivo de proteína seleccionado del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 DBDpp diferentes que se unen específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, la colección de vectores está contenida en

células hospedantes (por ejemplo, partículas virales). En otro ejemplo, la colección comprende una pluralidad de células hospedantes que expresan el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, las células hospedantes son fagos que expresan el DBDpp sobre su superficie. En algunos ejemplos, la colección de vectores comprende: (a) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos; (b) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo objetivo; (c) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo epítipo de un objetivo; (d) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente a diferentes epítipos de un objetivo; (e) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que compiten por la unión al mismo objetivo; o (f) 3 diferentes secuencias de ácidos nucleicos que codifican la misma secuencia de DBDpp. También se proporcionan células hospedantes que contienen los vectores.

En un ejemplo, una colección de vectores comprende una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos que codifican DBDpp, en donde el DBDpp codificado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de: (a) MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELA AFEKE IAAFESELQAYKKGKNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₅₅, X₅₈, X₅₉, X₆₂, X₆₅ y/o X₆₆, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural; (b) MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGG SEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKKGKNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₃₀, X₃₃, X₃₄, X₃₇, X₄₀, X₄₁ y/o X₄₄, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural; (c) MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉ X₄₀ELX₄₃AYKKGKNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3), en donde X₃₂, X₃₃, X₃₆, X₃₉, X₄₀, X₄₃, X₅₇, X₅₈, X₆₁, X₆₄, X₆₅ y/o X₆₈, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y; (d) MGSWX₅X₆FKX₉ X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKKGKNPEVE X₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₃₂, X₃₃, X₃₆, X₃₉, X₄₀, X₄₃, X₅₅, X₅₈, X₅₉, X₆₂, X₆₅ y/o X₆₆, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural; y (e) MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAX₃₀ FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKKGKNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₃₀, X₃₃, X₃₄, X₃₇, X₄₀, X₄₁, X₄₄, X₅₇, X₅₈, X₆₁, X₆₄, X₆₅ y/o X₆₈, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural; y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. En ejemplos aún adicionales, X_n es una supresión de un aminoácido (por ejemplo, opcionalmente una posición nula en la secuencia). En un ejemplo adicional, una pluralidad de vectores en la colección codifican una proteína de fusión de DBDpp. En otro ejemplo, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos. En una modalidad adicional, los diferentes objetivos unidos por el DBDpp codificado por los ácidos nucleicos en la colección se seleccionan del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular, y una molécula orgánica pequeña. En una modalidad adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 DBDpp diferentes que se unen específicamente a un objetivo de proteína seleccionado del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 DBDpp diferentes que se unen específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, una pluralidad de los vectores de la colección de vectores está contenida en células hospedantes (por ejemplo, partículas virales tales como fagos), E. coli, levadura y células de mamífero. En otro ejemplo, las células hospedantes expresan el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, las células hospedantes son fagos que expresan el DBDpp sobre su superficie. En algunos ejemplos, la colección de vectores comprende: (a) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos; (b) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo objetivo; (c) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo epítipo de un objetivo; (d) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente a diferentes epítipos de un objetivo; (e) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que compiten por la unión al mismo objetivo; o (f) 3 diferentes secuencias de ácidos nucleicos que codifican la misma secuencia de DBDpp. También se proporcionan células hospedantes que contienen los vectores.

En un ejemplo descrito, una colección de vectores comprende una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican DBDpp que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de: (a) MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAAFEKEIAAFESELQAYZ₂NPEVEX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAY RHN (SEQ ID NO:9), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₅₀, X₅₃, X₅₄, X₅₇, X₆₀ y/o X₆₁, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; (b) MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPEVEALRKEAAAIRDELQA YRHN (SEQ ID NO:7), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₂₈, X₃₁, X₃₂, X₃₅, X₃₈, X₃₉ y/o X₄₂, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; (c) MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAEL AAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:8), en donde X₃₀, X₃₁, X₃₄, X₃₇, X₃₈, X₄₁, X₅₂, X₅₃, X₅₆, X₅₉, X₆₀ y/o X₆₃, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2

a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; (d) MGSWX₅FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₃₀, X₃₁, X₃₄, X₃₇, X₃₈, X₄₁, X₅₀, X₅₃, X₅₄, X₅₇, X₆₀ y/o X₆₁, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; y (e)

5 MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RL

X₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAIX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPEVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₂₈, X₃₁, X₃₂, X₃₅, X₃₈, X₃₉, X₄₂, X₅₂, X₅₃, X₅₆, X₅₉, X₆₀ y/o X₆₃, es un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; y en

10 donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. En modalidades aún adicionales, X_n es una supresión de un aminoácido (por ejemplo, opcionalmente una posición nula en la secuencia). En un ejemplo adicional, una pluralidad de los vectores en la colección codifican una proteína de fusión de DBDpp. En otra modalidad, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4,

15 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos. En un ejemplo adicional, los diferentes objetivos unidos por el DBDpp codificado por los ácidos nucleicos en la colección se seleccionan del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En una modalidad adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 DBDpp diferentes que se unen

20 específicamente a un objetivo de proteína seleccionado del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 DBDpp diferentes que se unen específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, una pluralidad de los vectores de la colección de vectores están contenidos en células hospedantes. En otro ejemplo, las células

25 hospedantes (por ejemplo, partículas virales) expresan DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, las células hospedantes son fagos que expresan el DBDpp sobre su superficie. En algunos ejemplos, las células hospedantes son células de mamífero. En algunos ejemplos, la colección de vectores comprende: (a) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos; (b) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo objetivo; (c) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo epítipo de un objetivo; (d) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente a diferentes epítopos de un objetivo; (e) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que tienen diferentes secuencias que compiten por la unión al mismo objetivo; o (f) 3 diferentes secuencias de ácidos nucleicos que codifican la misma secuencia de DBDpp.

30 También se proporcionan células hospedantes que contienen los vectores.

35 El DBDpp de acuerdo con varias modalidades proporcionado en este documento posee actividades que incluyen pero no están limitadas a la unión a objetivos, la capacidad para unirse, vincularse y/o asociarse de otra manera con un objetivo de interés (por ejemplo, un objetivo de purificación, un objetivo terapéutico, un objetivo de diagnóstico, una marca de péptido y una proteína del suero tal como albúmina de suero humano (HSA) o una inmunoglobulina) in vitro o in vivo y la capacidad para servir como un sitio reactivo para vincular o asociar proteínas tales como proteínas de fusión de DBDpp con porciones adicionales (por ejemplo, un soporte sólido) y/u otras modificaciones. El DBDpp proporcionado en este documento también puede poseer propiedades y/o funcionalidades deseables adicionales que son útiles en la manufactura, purificación, formulación y aplicaciones biológicas, de diagnóstico y terapéuticas.

40 En algunas modalidades, un DBDpp se utiliza para unirse a, detectar, cuantificar, retirar y/o purificar un objetivo de interés en una muestra que contiene el objetivo.

45 Un ejemplo descrito proporciona un método para detectar un objetivo de interés en una muestra, que comprende: (a) poner en contacto la muestra con un DBDpp que se une específicamente al objetivo, bajo condiciones adecuadas para la unión específica del DBDpp al objetivo, para formar un complejo de objetivo/DBDpp, y (b) detectar la presencia del complejo y/o el objetivo capturado. En un ejemplo, el DBDpp se inmoviliza sobre un soporte sólido.

50 También se describe un método para cuantificar un objetivo de interés en una muestra que contiene el objetivo, que comprende: (a) poner en contacto la muestra con un DBDpp que se une específicamente al objetivo y que es inmovilizado sobre un soporte sólido, bajo condiciones que son adecuadas para la unión específica del DBDpp al objetivo, para formar un complejo de objetivo/DBDpp y (b) detectar la presencia del complejo de objetivo/DBDpp y/o el objetivo capturado, en donde la detección cuantitativa del producto indica, o tiene la capacidad de otra manera para ser correlacionada con, la cantidad del objetivo en la muestra.

55 Algunos ejemplos descritos proporcionan métodos para purificar un objetivo de interés de una muestra que contiene el objetivo que comprende: (a) poner en contacto una muestra que contiene un objetivo de interés con un DBDpp que se une específicamente al objetivo, bajo condiciones adecuadas para la unión específica del DBDpp al objetivo, y (b) recuperar el objetivo unido. En algunos ejemplos, el objetivo se recupera por medio de la elución. En un ejemplo el DBDpp es inmovilizado sobre un soporte sólido. En una modalidad adicional, la elución del objetivo unido se supervisa por medio de la absorción de luz ultravioleta, u otra técnica de detección basada en la visualización o productos químicos. En algunos ejemplos, se proporcionan métodos para retirar un objetivo de interés no deseado de una

60 Algunos ejemplos descritos proporcionan métodos para purificar un objetivo de interés de una muestra que contiene el objetivo que comprende: (a) poner en contacto una muestra que contiene un objetivo de interés con un DBDpp que se une específicamente al objetivo, bajo condiciones adecuadas para la unión específica del DBDpp al objetivo, y (b) recuperar el objetivo unido. En algunos ejemplos, el objetivo se recupera por medio de la elución. En un ejemplo el DBDpp es inmovilizado sobre un soporte sólido. En una modalidad adicional, la elución del objetivo unido se supervisa por medio de la absorción de luz ultravioleta, u otra técnica de detección basada en la visualización o productos químicos. En algunos ejemplos, se proporcionan métodos para retirar un objetivo de interés no deseado de una

muestra y en donde el objetivo no deseado unido se desecha directamente o es eluido (o recolectado o separado de otra manera) y luego desechado.

Un ejemplo adicional proporciona un método de examen de una colección de DBDpp para un DBDpp que se une específicamente a un objetivo de interés, que comprende: (a) obtener una pluralidad de células hospedantes (por ejemplo, partículas virales, fagos, bacterias y/o células de mamíferos) que expresan una colección de DBDpp sobre su superficie; (b) poner en contacto la pluralidad de células hospedantes con un objetivo de interés bajo condiciones que son adecuadas para la unión específica del objetivo a un DBDpp; y (c) determinar la unión del objetivo al DBDpp. En una modalidad, las células hospedantes son fagos que expresan el DBDpp sobre su superficie.

También se describen métodos de utilización del DBDpp en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. Un ejemplo descrito proporciona un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) que se une específicamente a un objetivo de interés terapéutico a un sujeto necesitado del mismo. En algunos ejemplos, la enfermedad o trastorno es cáncer, una enfermedad o trastorno del sistema inmune o una infección. También se describen métodos de tratamiento de una enfermedad o trastorno que comprenden co-administrar un agente terapéutico adicional junto con un DBDpp.

Adicionalmente se describen métodos para tratar o prevenir el cáncer que comprenden administrar un linfocito T DBDpp-CAR a un paciente (por ejemplo, predispuesto a o que tiene un cáncer) que expresa un antígeno tumoral sobre la superficie de células objetivo, y en donde el DBDpp se une específicamente al antígeno.

Ciertos métodos descritos anteriormente y expuestos en detalle adicional posteriormente describen ciertas acciones tomadas por un practicante; sin embargo, se debe entender que también pueden incluir la instrucción de esas acciones por otra parte. De esta manera, acciones tales como "administrar una célula T que comprende un polipéptido-CAR de unión específico para un objetivo" incluyen "enseñar la administración de una célula T que comprende un polipéptido-CAR de unión específico para un objetivo".

Breve descripción de los dibujos

FIGURAS 1A-1B. Representación esquemática que describe el modelo de homología derivado de la SEQ ID NO:1 del DBDpp. Vista transversal que ilustra las hélices y las tres caras del dominio (FIGURA 1A). Vista longitudinal que ilustra la posición del residuo E19, terminal N (NT) y terminal C (CT) (FIGURA 1B).

FIGURAS 2A-2J. Representación esquemática de diferentes modelos de homología de DBDpp basados en el andamiaje de referencia de la SEQ ID NO:1. Los residuos fijados como objetivo para la modificación en las colecciones de Caras (F1, F2 y F3) y colecciones Combinadas (C1 y C2) del DBDpp son sombreados. Las vistas en perspectiva longitudinal y transversal de la colección F1 se muestran en la FIGURA 2A y la FIGURA 2B respectivamente. Las vistas en perspectiva longitudinal y transversal de la colección F2 se muestran en la FIGURA 2C y la FIGURA 2D respectivamente. Las vistas en perspectiva longitudinal y transversal de la colección F3 se muestran en la FIGURA 2E y la FIGURA 2F respectivamente. Las vistas en perspectiva longitudinal y transversal de la colección C1 se muestran en la FIGURA 2G y FIGURA 2H respectivamente. Las vistas en perspectiva longitudinal y transversal de la colección C2 se muestran en la FIGURA 2I y la FIGURA 2J respectivamente. La terminal N (NT) y la terminal C (CT) se indican para cada modelo.

FIGURAS 3A-3D. FIGURA 3A. Representación esquemática de la construcción de exhibición de fagos para el uso de acuerdo con varias modalidades dadas a conocer en este documento. FIGURA 3B. Representa un mapa de vector lineal para el vector de fagómido pComb utilizado para generar las colecciones dadas a conocer en este documento. Las colecciones se crearon a través de la mutagénesis de Kunkel, utilizando oligonucleótidos que tienen codones de NNK o trímero. Las secuencias de péptidos variantes de DBDpp se expresaron dentro del marco de lectura, entre la secuencia de la marca de péptido FLAG y el gen M13 pIII. Los DBDpp se expresaron como una fusión del gen pIII N-terminal, bajo el control de un péptido de señal DsbA. FIGURA 3C. Representa un mapa de vector lineal para el vector de fagómido pComb utilizado para generar colecciones de DBDpp descritas en los ejemplos. Los DBDpp se expresaron dentro del marco de lectura, entre el péptido de señal DsbA y el gen M13 pIII. El vector de fagómido pComb modificado es el mismo que aquel representado en la FIGURA 3B, pero falta la secuencia de marca de péptido FLAG, la cual es de acuerdo con ciertas modalidades dadas a conocer en este documento (en donde la marca FLAG es retirada opcionalmente o reemplazada por otra variedad de marca). La FIGURA 3D representa datos de un ensayo de unión comparativa. Las fusiones de la marca FLAG N-terminal se expresaron y se purificaron a partir de cultivos de E. coli. La evaluación de la unión basada en un ensayo ELISA demostró que el FLAG-pb04 purificado (objetivos PD-L1) se une de una manera dependiente de la dosis a pocillos de microtítulo revestidos con PD-L1-Fc, mientras que el FLAG- α 3D (la secuencia de referencia de la SEQ ID NO:49, con una marca FLAG N-terminal) no exhibe un cambio en la unión.

FIGURAS 4A-4D. Los DBDpp tienen especificidades de unión novedosas y confieren estas especificidades de unión novedosas a otra molécula (por ejemplo, un anticuerpo) como parte de una proteína de fusión (por ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo-DBDpp). Representación esquemática que ilustra la fusión recombinante del DBDpp (mostrado como un círculo) a la terminal C (FIGURA 4A) y la terminal N (FIGURA 4B) de una cadena pesada de anticuerpo. Las fusiones de DBDpp-anticuerpo se crearon utilizando un anticuerpo específico para RSV (SYN) y cualquiera del péptido sin objetivo de la SEQ ID NO:1 (DBD) o el DBDpp-específico para CD137 (bb10).

Los DBDpp se fusionan a la terminal N (bb10-SYN y DBD-SYN) o la terminal C (SYN-bb10 y SYN-DBD). Las cuatro fusiones de anticuerpos se unen a RSV (FIGURA 4C). Sin embargo, la fusión de bb10 a ya sea la terminal N (bb10-SYN) o la terminal C (SYN-bb10) de la cadena pesada de anticuerpo confiere una especificidad de unión a CD137 novedosa a un anticuerpo de otra manera mono-específico (FIGURA 4D).

FIGURAS 5A-5C. FIGURA 5A. Ilustra una representación esquemática de proteínas de fusión de DBDpp-CAR de acuerdo con varias modalidades dadas a conocer en este documento. Seis diferentes formatos de DBDpp-CAR se presentan, a manera de ejemplo, y se pretende que sean ilustrativos y no limitantes. Los dominios extracelulares de DBDpp pueden ser específicos para un objetivo individual (por ejemplo DBDpp "A") o más de un objetivo o epítipo (por ejemplo DBDpp "A" y DBDpp "B"). Se muestran ejemplos no limitantes de dominios transmembrana (TM), ya que son ejemplos no limitantes de dominios intracelulares derivados de CD3, CD28 y 41BB. Los dominios se vinculan opcionalmente a través de conectores peptídicos (mostrados en sombreado). FIGURA 5B. Ilustra una representación esquemática adicional de una fusión de DBDpp-CAR unida a la membrana (por ejemplo, extracelular). FIGURA 5C. Ilustra una representación esquemática de un DBDpp soluble.

FIGURAS 6A-6C. Las fusiones de DBDpp multi-específicas reconocen objetivos de la superficie celular. El análisis de FACS indica que los anticuerpos biespecíficos bb10-SYN y SYNbb10 se unen (histograma sombreado) a una célula CEM activada a niveles mayores que el SYN solo (contorno negro). La unión más débil observada con la fusión N-terminal de bb10 (FIGURA 6A) en comparación con la fusión C-terminal (FIGURA 6B) es consistente con los datos anteriores del ensayo ELISA. URE1 es un anticuerpo recombinante construido formado a partir de dominios variables del urelumab que fija como objetivo a CD137 fusionado al andamiaje de IgG. La unión de las células CEM se realizó después de ser activadas con PMA (50 ng/ml) y ionomicina (500 ng/ml) durante 48 horas. La detección del anticuerpo unido se realizó con Fc anti-IgG1 (FITC-A).

FIGURAS 7A-7D. El DBDpp confiere actividad biológica novedosa a una proteína de fusión de anticuerpo-DBDpp. La activación de CD137 por un ligando o anticuerpos agonistas, tal como urelumab, provoca una cascada de señalización que da por resultado la producción de citocinas, la expresión de moléculas anti-apoptóticas y respuestas inmunes mejoradas. El potencial agonista del DBDpp que fija como objetivo el CD137, bb10 se evaluó al medir la capacidad de bb10-SYN y SYN-bb10 para provocar la liberación de citocinas de PBMC. Las fusiones de bb10 se sometieron a prueba en formatos tanto solubles como revestidos en pocillos de plástico. Las PBMCs en medio RPMI completo se agregaron a placas y se incubaron durante toda la noche. Los sobrenadantes de cultivo de células luego se midieron para TNF α e IL-8 utilizando un ensayo ELISA. Para poblaciones de PBMC de dos donadores, las fusiones de bb10 provocan la secreción de IL8 y TNF α a niveles iguales a o mayores que aquel de un anticuerpo monoclonal anti-CD137 agonista, URE1.

FIGURA 8. La estabilidad in vivo es crucial para la eficacia clínica de la mayoría de productos bioterapéuticos. Las mediciones farmacocinéticas de fusiones de bb10 se realizaron para evaluar la estabilidad relativa de DBDpp en comparación con el asociado de fusión de anticuerpo. La estabilidad in vivo se determinó por medio del análisis de la unión tanto a RSV como a CD137 del anticuerpo bi-específico presente en el suero de ratones CD1 que recibieron una inyección intravenosa individual (1 mg/kg) de la fusión. Las muestras de suero se recolectaron en 15 minutos y 48 horas, y se sometieron a ensayo por medio de ELISA. Las proteínas de fusión de DBDpp tanto N-terminales como C-terminales demuestran estabilidad sostenida in vivo. Como se plantea con mayor detalle posteriormente, varias modalidades involucran fusiones de DBDpp con estabilidad extendida (por ejemplo, en el orden de 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 6 días, 8 días, 10 días o más, incluyendo tiempos entre aquellos listados).

FIGURA 9. La FIGURA 9 representa la purificación mediante HPLC de un DBDpp producido de acuerdo con varias modalidades dadas a conocer en este documento.

FIGURA 10. La FIGURA 10 representa un análisis de SDS-PAGE de un DBDpp purificado que se produjo de acuerdo con varias modalidades dadas a conocer en este documento. El carril 1 es un marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde a un DBDpp purificado de la SEQ ID NO:58 y los carriles 3-9 corresponden a un DBDpp purificado de la SEQ ID NOS: 51-57, respectivamente.

FIGURA 11. La FIGURA 11 representa un espectro desconvolucionado de ionización por electroatomización-espectrometría de masas (ESI-MS) de la SEQ ID NO. 54.

FIGURAS 12A-12P. Las FIGURAS 12A-12P representan datos relacionados con la unión del DBDpp que fija como objetivo el CD137 al CD137 que se inmovilizó sobre una superficie sólida. Las FIGURAS 12A, 12C, 12E, 12G, 12I, 12K, 12M y 12O son sensogramas para DBDpps de las SEQ ID NOS: 51 (12A), 52 (12C), 53 (12E), 54 (12G), 55 (12I), 56 (12K), 57 (12M) y 58 (12O). Las FIGURAS 12B, 12D, 12F, 12H, 12J, 12L, 12N y 12P representan datos de unión de régimen permanente correspondientes para DBDpps de la SEC ID 51 (12B), 52 (12D), 53 (12F), 54 (12H), 55 (12J), 56 (12L), 57 (12N) y 58 (12P).

FIGURA 13. La FIGURA 13 representa datos cromatográficos para la purificación de una proteína de CD137 del sobrenadante de células de ovario de hámster chino (CHO).

FIGURAS 14A-14B. Análisis de proteínas purificadas utilizando DBDpp. La FIGURA 14A representa un gel teñido con Coomassie cargado con fracciones purificadas de columnas de purificación de DBDpp. El carril 1 es un marcador de peso molecular. El carril 2 es una proteína de CD137 purificada utilizando IMAC, y los carriles 3-8 son eluatos de columnas con varios DBDpp de acuerdo con varias modalidades descritas en este documento. La FIGURA 14B es un análisis de inmunotransferencia western con muestras correspondientes a aquellas mostradas en la FIGURA 14A.

FIGURAS 15A-15D. Estabilidad térmica de DBDpp. La FIGURA 15A representa la evaluación de scFv de DR5 que se une a pocillos de microplacas revestidos con PD-L1PD-L1-Fc después de la exposición a varias temperaturas elevadas. La FIGURA 15B representa datos que muestran una correlación entre la temperatura incrementada y la

unión reducida a PDL1 por un scFv dirigido a PD-L1PD-L1. La FIGURA 15C muestra un DBDpp, de acuerdo con una modalidad dada a conocer en este documento (DBDpp pb04), afinidad de unión a PD-L1PD-L1 retenida después de ser expuesto a temperaturas crecientes, hasta 100°C. La FIGURA 15D muestra un DBDpp adicional (DBDpp pb06) que también demuestra estabilidad térmica y puede unirse a PD-L1PD-L1 después de ser expuesto a temperaturas de hasta 100°C.

FIGURAS 16A-16B. Reactividad cruzada de DBDpp. La FIGURA 16A representa datos relacionados con la capacidad de DBDpp para unirse a objetivos a través de especies. En particular, la FIGURA 16A demuestra que un DBDpp soluble dirigido contra PD-L1 puede unirse a PD-L1 de humano (traza superior), así como también PD-L1 de cynomolgus (traza inferior) con afinidades de unión similares. La FIGURA 16B representa datos de citometría de flujo que confirman que cuando se expresa en una célula T, específicamente una célula T receptora de antígenos quiméricos, la célula T puede reconocer y unirse al PD-L1 tanto de humano como de cynomolgus.

FIGURA 17. Evaluación de la expresión de DBDpp-CAR y unión a objetivos. La FIGURA 17 representa datos relacionados con la expresión de DBDpp-CAR y la unión a CD-123-Fc de varias células HEK-293T DBDpp-CAR candidatas.

FIGURA 18. Los DBDpp median la transducción de señales. La FIGURA 18 representa datos relacionados con la expresión y capacidad de células Jurkat DBDpp-CAR para funcionar a través de una vía de señalización intracelular.

FIGURAS 19A-19B. Las células T CD123-DBDpp-CAR producen citocinas en respuesta a la unión a objetivos. La FIGURA 19A muestra datos relacionados con la producción de interferón gamma (IFN γ) por células T que expresan DBDpp-CARs que fijan como objetivo a CD123. La FIGURA 19B representa datos similares que miden la producción de interleucina 2 (IL2) por células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el CD123.

FIGURAS 20A-20B. Las células T PD-L1-DBDpp-CAR producen citocinas en respuesta a la unión a objetivos. La FIGURA 20A muestra datos relacionados con la producción de interferón gamma (IFN γ) por células T que expresan DBDpp-CARs que fijan como objetivo el PD-L1. La FIGURA 20B representa datos similares que miden la producción de interleucina 2 (IL2) por células T DBDpp-CAR que expresan PD-L1.

FIGURA 21. Las células T CD123-DBDpp-CAR proliferan en respuesta a la unión a objetivos. La FIGURA 21 representa datos relacionados con la proliferación de células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el CD123 en comparación con un control y scFv que fijan como objetivo el CD123.

FIGURA 22. Las células T PD-L1-DBDpp-CAR proliferan en respuesta a la unión a objetivos. La FIGURA 22 representa datos relacionados con la proliferación de células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el PD-L1 en comparación con condiciones simuladas.

FIGURAS 23A-23B. Las células T que expresan DBDpp-CARS no experimentan un agotamiento excesivo a un grado mayor que el scFv. La FIGURA 23A representa la expresión de tres marcadores de agotamiento (LAG-3, PD-1 y TIM3) en células T que expresan varios DBDpp-CARS a niveles similares de expresión de esos marcadores en scFv. La FIGURA 23B muestra datos de citometría de flujo que representan la expresión similar de marcadores de agotamiento en células T DBDpp-CAR (que expresan DBDpp cg06 que fija como objetivo el CD123) en comparación con una célula T CAR que expresa el scFv específico para CD123 (32716).

FIGURAS 24A-24D. Las células T que expresan DBDpp-CARS se desgranulan en respuesta a la unión a objetivos. La FIGURA 24A representa la producción de CD107a (como un marcador de la desgranulación de las células T DBDpp-CAR) cuando las células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el CD123 se cultivan solas. La FIGURA 24B muestra la producción de CD107a cuando las células T DBDpp-CAR son co-cultivadas con células tumorales K562 negativas para CD123. La FIGURA 24C muestra el CD107a cuando las células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el CD123 son co-cultivadas con células BDCM positivas para CD123. La FIGURA 24D representa datos de réplicas experimentales de co-cultivo de células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el CD123 con células BDCM positivas para CD123.

FIGURAS 25A-25D. Las células T que expresan PD-L1-DBDpp-CARS se desgranulan en respuesta a la unión a objetivos. La FIGURA 25A muestra la expresión de CD107a (como un marcador de la desgranulación de células T DBDpp-CAR) cuando las células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el PD-L1 se cultivan solas, por ejemplo, inactivadas. La FIGURA 25B muestra la medición de CD107a cuando las células T DBDpp-CAR son co-cultivadas con células tumorales K562 negativas para PD-L1. La FIGURA 25C muestra el CD107a incrementado cuando las células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el PD-L1 son co-cultivadas con células SUDHL1 positivas para PD-L1. La FIGURA 25D representa datos de réplicas experimentales de co-cultivo de células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el PD-L1 con células SUDHL1 positivas para PD-L1.

FIGURAS 26A-26D. Las células T que expresan DBDpp-CARS median la citotoxicidad tumoral específica para objetivos. La FIGURA 26A muestra datos relacionados con el porcentaje de aniquilación de células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el CD123 de células tumorales K562 que son negativas para CD123. La FIGURA 26B muestra porcentajes de aniquilación cuando las células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el CD123 son co-cultivadas con células BDCM positivas para CD123. Los datos de las FIGURAS 26A y 26B se generaron utilizando células T de una muestra de sangre de un primer donador. Las FIGURAS 26C y 26D muestran datos similares de células T recolectadas de un segundo donador.

FIGURAS 27A-27F. Las células T que expresan DBDpp-CARS median la citotoxicidad tumoral específica para objetivos. La FIGURA 27A muestra datos relacionados con el porcentaje de aniquilación de células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el PD-L1 de células tumorales K562 que son negativas para PD-L1. Las células T CAR que expresan los diversos DBDpp que fijan como objetivo el PD-L1 exhibieron tasas de aniquilación más bajas que los controles simulados. Datos similares se muestran en las FIGURAS 27C y 27E para dos donadores adicionales. La FIGURA 27B muestra porcentajes de aniquilación elevados cuando las células T DBDpp-CAR que fijan como

objetivo el PD-L1 son co-cultivadas con células SUDHL1 positivas para PD-L1. Datos similares se muestran en las FIGURAS 27D y 27F para dos donadores adicionales.

FIGURAS 28A-28D. DBDpp que tienen potencial de inmunogenicidad reducido. Debido a que los DBDpp como se dan a conocer en este documento son sintéticos, se realizó un análisis para identificar los epítomos potencialmente inmunógenos. Un modelo tridimensional de un DBDpp (cg06) se muestra en la FIGURA 28A. La FIGURA 28B representa el cg06 con uno (de tres) de los epítomos potencialmente inmunógenos modificados para ser potencialmente menos inmunógenos. La FIGURA 28C representa el cg06 con dos (de tres) de los epítomos potencialmente inmunógenos modificados. La FIGURA 28D representa el cg06 con los tres epítomos potencialmente inmunógenos modificados.

FIGURAS 29A-29B. Los DBDpp con epítomos modificados retienen funcionalidad. La FIGURA 29A representa datos relacionados con células T CAR que expresan variantes del DBDpp (cg06) que fija como objetivo el CD123. Incluso con los tres epítomos potencialmente inmunógenos retirados de la secuencia del DBDpp, las variantes retienen la capacidad para mediar la transducción de células (activando células Jurkat diseñadas para expresar luciferasa) después de la unión a células objetivo BDCM positivas para CD123 (cg06 no modificado designado con una flecha). La FIGURA 29B muestra una eficacia similar cuando variantes modificadas se unen a células KG-1a positivas para CD123 (cg06 no modificado designado con una flecha).

FIGURAS 30A-30B. Expresión de marcadores dobles en células tumorales. La FIGURA 30A representa datos de citometría de flujo para la expresión de CD123 en células K562, células KG1a, células BDCM, células SUDHL o células H460. La FIGURA 30B representa datos de citometría de flujo para la expresión de PD-L1 en las mismas líneas de células.

FIGURAS 31A-31E. Células T DBDpp-CAR biespecíficas. La FIGURA 31A muestra el porcentaje de células T que expresan DBDpp-CARs que fijan como objetivo el CD123. La FIGURA 31B muestra el porcentaje de células T que expresan DBDpp-CARs que fijan como objetivo el PD-L1. La FIGURA 31C muestra el porcentaje de células T que expresan DBDpp-CARs que fijan como objetivo el CD123-PD-L1 biespecíficos (expresados con DBDpp cg06 distal a la membrana de células T contra el DBDpp pb04). La FIGURA 31D muestra el porcentaje de células T que expresan DBDpp-CARs que fijan como objetivo el PD-L1-CD123 biespecíficos (expresados con DBDpp pb04 distal a la membrana de células T contra el DBDpp cg06). La FIGURA 31E representa datos relacionados con la señalización intracelular incrementada de DBDpp biespecíficos.

FIGURA 32. Ensayo de unión competitiva a DBDpp. La FIGURA 32 demuestra una modalidad de un ensayo de unión competitiva que se puede utilizar para identificar DBDpp que exhiben una unión a epítomos compartida aunque los DBDpp sometidos a prueba tengan diferentes secuencias de aminoácidos primarias.

Descripción detallada de la invención

Los subtítulos de sección utilizados en este documento son para fines de organización únicamente y de ninguna manera se deben interpretar como limitantes del contenido descrito.

Definición de Términos

Se entiende que siempre que las modalidades se describan en este documento con las palabras "que comprende" también se proporcionan modalidades de otra manera análogas descritas en términos de "que consiste de" y/o "que consiste esencialmente de". Sin embargo, cuando se utilizan en las reivindicaciones como frases transitorias, cada una debe ser interpretada por separado y en un contexto legal y factual (por ejemplo, "que comprende" se considera más de una frase abierta mientras que "que consiste de" es más exclusivo y "que consiste esencialmente de" logra un punto intermedio).

Como se utiliza en este documento, la forma singular "un", "una", "el" y "la" incluye referencias plurales a menos que se indique de otra manera.

Se pretende que el término "y/o" como se utiliza en una frase tal como "A y/o B" en este documento incluya tanto A como B; A o B; A (solo); y B (solo). Del mismo modo, se pretende que el término "y/o", como se utiliza en una frase tal como "A, B y/o C" comprenda cada una de las siguientes modalidades: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan de manera intercambiable en este documento para referirse a un polímero biológico que comprende unidades derivadas de aminoácidos vinculados a través de enlaces de péptidos; una proteína puede estar compuesta de dos o más cadenas de polipéptidos.

Los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina", como se utilizan de manera intercambiable en este documento, incluyen anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpos que incluyen cualquier dominio funcional de un anticuerpo tal como un fragmento de unión a antígenos o cadenas individuales del mismo, un dominio efector, un epítipo de unión a receptores salvajes, o una porción del mismo. Un anticuerpo típico comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento

como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida de un dominio, C1. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDRs), entremezcladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones de armazón (FW). Cada VH y VL está compuesta de tres CDRs y cuatro FWs, dispuestas de la terminal amino a la terminal carboxi en el siguiente orden: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedante, que incluyen varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Los tipos no limitantes de anticuerpos de la presente descripción incluyen anticuerpos típicos, scFv, y combinaciones de los mismos donde, por ejemplo, un DBDpp es vinculado covalentemente (por ejemplo, a través de enlaces de péptidos o a través de un conector químico) a la terminal N de ya sea la cadena pesada y/o la cadena ligera de un anticuerpo completo (longitud completa) típico, o intercalado en la cadena H y/o la cadena L de un anticuerpo completo.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a cualquier dominio funcional de un anticuerpo tal como un fragmento de unión a antígenos o cadenas individuales del mismo, un dominio efector o una porción del mismo, y un epítipo de unión a receptores salvajes o una porción del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena individual y anticuerpos multi-específicos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento de anticuerpo" como se utiliza en este documento comprende un sitio de unión a antígenos o un sitio de unión a epítopos. En una modalidad, la proteína de fusión de DBDpp comprende un dominio efector o una porción del mismo. En una modalidad, la proteína de fusión de DBDpp comprende un epítipo de unión a receptores salvajes, o una porción del mismo.

Como se utiliza en este documento, se entiende que el término "región Fc" o simplemente "Fc" significa la porción carboxilo-terminal de una región constante de cadena de inmunoglobulina, preferiblemente una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, o una porción de la misma, por ejemplo, una región Fc de inmunoglobulina puede comprender (1) un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3, (2) un dominio CH1 y un dominio CH2, (3) un dominio CH1 y un dominio CH3, (4) un dominio CH2 y un dominio CH3 o (5) una combinación de dos o más dominios y una región bisagra de inmunoglobulina. En una modalidad preferida la región Fc de inmunoglobulina comprende por lo menos una región bisagra de inmunoglobulina, un dominio CH2 y un dominio CH3, y carece preferiblemente del dominio CH1. En una modalidad, la clase de inmunoglobulina de la cual se deriva la región constante de cadena pesada es IgG (Igy) (subclases γ 1, 2, 3 o 4). Se pueden utilizar otras clases de inmunoglobulina, IgA (Ig α), IgD (Ig δ), IgE (Ig ϵ) e IgM (Ig μ). La elección de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina apropiada se plantea en detalle en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.541.087 y 5.726.044, cada una de las cuales se incorpora en este documento a manera de referencia, en su totalidad. La elección de secuencias de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina particulares de ciertas clases y subclases de inmunoglobulina para lograr un resultado particular se considera que se encuentra dentro del nivel de habilidad en el campo. La porción de la construcción de ADN que codifica la región Fc de inmunoglobulina comprende preferiblemente por lo menos una porción de un dominio bisagra, y preferiblemente por lo menos una porción de un dominio CH3 de Fc gamma o los dominios homólogos en cualquiera de IgA, IgD, IgE o IgM. Adicionalmente, se contempla que la sustitución o supresión de aminoácidos dentro de las regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina pueden ser útiles en la práctica de los métodos y composiciones dados a conocer en este documento. Un ejemplo sería introducir sustituciones de aminoácidos en la región CH2 superior para crear una variante Fc con afinidad reducida por receptores de Fc (Cole, J. Immunol. 159:3613 (1997)).

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la cual células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcRs) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen un anticuerpo unido en una célula objetivo y causan subsecuentemente la lisis (u otros efectos citotóxicos) de la célula objetivo. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede utilizar cualquier ensayo de ADCC in vitro que sea conocido en el campo, tal como aquel descrito en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,500,362 o 5,821,337. Las células efectoras útiles para estos ensayos incluyen, pero no están limitadas a, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Asesinas Naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquel dado a conocer en Clynes y colaboradores PNAS 95:652-656 (1998).

Los términos "fragmento(s) variable(s) de cadena individual" o anticuerpos "scFv" como se utilizan en este documento se refieren a formas de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de anticuerpos) que comprenden las regiones variables de únicamente las cadenas pesadas y ligeras, conectadas por un péptido conector. En una modalidad, una proteína de fusión de DBDpp comprende un DBDpp y un scFv.

El término "conector" se refiere a un péptido u otro vínculo químico localizado entre un DBDpp y otro polipéptido de una proteína de fusión de DBDpp. Los conectores adecuados para acoplar los dos o más DBDpp vinculados serán claros para las personas expertas en el campo y los ejemplos no limitantes se describen en este documento.

El término "vinculado de manera operable", como se utiliza en este documento, indica que dos moléculas son adheridas con el fin de que cada una retenga por lo menos algún nivel de actividad funcional que cada molécula tenía sola (asumiendo que cada molécula tenía una actividad funcional). En modalidades cuando una molécula no tenía actividad funcional, se reviste de manera operable con otra molécula si la otra molécula retiene por lo menos algún nivel de su actividad funcional. Vinculado de manera operable también se puede referir a un vínculo de dos o más moléculas no funcionales. Dos moléculas pueden ser "vinculadas de manera operable" si éstas se adhieren directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un conector).

Los términos "se une específicamente" o "que tiene afinidad selectiva por" significan que un agente de unión tal como un DBDpp reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad o con alguna combinación de las anteriores al epítipo, proteína o molécula objetivo que con sustancias alternativas, que incluyen proteínas no relacionadas con el epítipo objetivo. Debido a la identidad entre secuencias entre proteínas homólogas de diferentes especies, la unión específica puede incluir, en varias modalidades, un agente de unión que reconoce una proteína u objetivo en más de una especie. Del mismo modo, debido a la homología dentro de ciertas regiones de secuencias de polipéptidos de diferentes proteínas, la unión específica puede incluir un agente de unión que reconoce más de una proteína u objetivo. Se entiende que, en ciertas modalidades, un agente de unión que se une específicamente a un primer objetivo puede unirse o no específicamente a un segundo objetivo. Como tal, la "unión específica" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva, por ejemplo, la unión a un objetivo individual. De esta manera, un agente de unión puede unirse específicamente, en ciertas modalidades, a más de un objetivo. En ciertas modalidades, múltiples objetivos pueden ser unidos por el mismo sitio de unión a antígenos en el agente de unión.

"Objetivo" se refiere a cualquier molécula o combinación de moléculas que puede ser unida por un DBDpp tal como una proteína de fusión de DBDpp, u otro componente de la proteína de fusión de DBDpp tal como un anticuerpo o un fragmento de dominio variable de anticuerpo.

Los términos "epítipo" y "determinante antigénico" se utilizan de manera intercambiable en este documento y se refieren a aquella porción de cualquier molécula (por ejemplo, un objetivo de interés) que tiene la capacidad de ser reconocida y unida específicamente por un agente de unión particular (por ejemplo, un DBDpp o anticuerpo). Cuando la molécula reconocida es un polipéptido, los epítopos se pueden formar a partir de aminoácidos contiguos y aminoácidos no contiguos y/u otros grupos superficiales químicamente activos de moléculas (tales como carbohidratos) yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos son retenidos típicamente tras la desnaturalización de proteínas, mientras que los epítopos formados por el plegamiento terciario se pierden típicamente tras la desnaturalización de proteínas. Un epítipo incluye típicamente por lo menos 3 aminoácidos, y más usualmente, por lo menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

Una "marca de péptido" como se utiliza en este documento se refiere a una secuencia de péptidos que es parte de o es adherida (por ejemplo a través de ingeniería genética) a otra proteína, para proporcionar una función a la fusión resultante. Por lo general las marcas de péptidos son relativamente cortas en comparación con una proteína a la cual se fusionan; a manera de ejemplo, las marcas de péptidos son, en varias modalidades, de cuatro o más aminoácidos de longitud, tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 o más aminoácidos. En algunas modalidades, el DBDpp es una proteína de fusión que contiene una marca de péptido. En otras modalidades, el DBDpp se une específicamente a una marca de péptido. Numerosas marcas de péptidos que tienen usos como se proporciona en este documento son conocidas en el campo. Los ejemplos de marcas de péptidos pueden ser un componente de una proteína de fusión de DBDpp o un objetivo unido por un DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp). Los ejemplos de marcas de péptidos que pueden ser un componente de una proteína de fusión de DBDpp o un objetivo unido por un DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) incluyen pero no están limitados a HA (hemaglutinina), c-myc, la glicoproteína D del virus de Herpes Simple (gD), T7, GST, GFP, MBP, marcas de Strep, marcas de His, marcas de Myc, marcas de TAP y marca FLAG^{MR} (Eastman Kodak, Rochester, N.Y.) Del mismo modo, los anticuerpos para el epítipo de la marca permiten la detección y localización de la proteína de fusión en, por ejemplo, la purificación por afinidad, inmunotransferencias Western, ensayos ELISA e inmunotinción de células.

El término "de origen natural" cuando se utiliza en relación con materiales biológicos tales como moléculas de ácidos nucleicos, polipéptidos y células hospedantes, se refiere a aquellos que se encuentran en la naturaleza y no son modificados por un ser humano. Por el contrario, "no natural" o "sintético" cuando se utilizan en relación con materiales biológicos se refieren a aquellos los cuales no se encuentran en la naturaleza y han sido modificados por un ser humano.

Como se utiliza en este documento "modificaciones" con respecto a la secuencia del andamiaje de referencia SEQ ID NO:1 (o con respecto a otras secuencias) incluye sustituciones, supresiones, inserciones y/o adiciones de la secuencia de la posición de aminoácido correspondiente de la SEC ID NO:1 (o con respecto a la posición correspondiente de la otra secuencia).

Una "sustitución" con respecto a la secuencia del andamiaje de referencia SEQ ID NO:1 (o con respecto a otras secuencias) se refiere a un reemplazo de un residuo de aminoácido particular por un residuo de aminoácido diferente

en una posición de aminoácido correspondiente de la SEQ ID NO:1 (o con respecto a la posición correspondiente de la otra secuencia).

Una sustitución de aminoácido "conservadora" es una en la cual un residuo de aminoácido es reemplazado por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en el campo, que incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina (K), arginina (R), histidina (H)), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico (D), ácido glutámico (E)), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina (G), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), tirosina (Y), cisteína (C)), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), fenilalanina (F), metionina (M), triptófano (W), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina (T), valina (V), isoleucina (I)) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina (Y), fenilalanina (F), triptófano (W), histidina (H)). Por ejemplo, una sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. En una modalidad, las sustituciones conservadoras en las secuencias del DBDpp dan por resultado la unión específica del DBDpp que contiene la sustitución al objetivo de interés al cual se une. En una modalidad, las sustituciones conservadoras en las secuencias del DBDpp no anulan la unión del DBDpp que contiene la sustitución al objetivo de interés al cual se une. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras y sustituciones no conservadoras de nucleótidos y aminoácidos las cuales confieren, alteran o mantienen afinidad de unión selectiva son conocidos en el campo (véase, por ejemplo, Brummell, *Biochem. 32*:1180-1187 (1993); Kobayashi, *Protein Eng. 12*(10):879-884 (1999); y Burks, *PNAS 94*:412-417 (1997)).

Una sustitución de aminoácido "no conservadora" es una en la cual un residuo de aminoácido es reemplazado por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral diferente. En una modalidad, las sustituciones no conservadoras en las secuencias del DBDpp dan por resultado la unión específica del DBDpp que contiene la sustitución al objetivo de interés al cual se une. En una modalidad, las sustituciones no conservadoras en las secuencias del DBDpp no anulan la unión del DBDpp que contiene la sustitución al objetivo de interés al cual se une.

"Aminoácidos no naturales", "análogos de aminoácidos" y "residuos de aminoácidos no estándar" se utilizan de manera intercambiable en este documento. Los aminoácidos no naturales que pueden ser sustituidos en un DBDpp como se proporciona en este documento son conocidos en el campo. En una modalidad el aminoácido no natural es 4-hidroxiprolina la cual puede ser sustituida por prolina; 5-hidroxilisina la cual puede ser sustituida por lisina; 3-metilhistidina la cual puede ser sustituida por histidina; homoserina la cual puede ser sustituida por serina; y ornitina la cual puede ser sustituida por lisina. Los ejemplos adicionales de aminoácidos no naturales que pueden ser sustituidos en un DBDpp incluyen, pero no están limitados a moléculas tales como: D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido alfa-aminoisobutírico, ácido A-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, gamma-Abu, épsilon-Ahx, ácido 6-aminoheptanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, beta-alanina, lantionina, deshidroalanina, ácido gamma-aminobutírico, selenocisteína y fluoraminoácidos de pirrolisina, aminoácidos de diseñador tales como aminoácidos de beta-metilo, aminoácidos de alfa-metilo C y aminoácidos de N-alfa-metilo, o combinaciones de aminoácidos no naturales. Los aminoácidos no naturales aún adicionales pueden incluir ácido 4-aminobutírico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, 2-tienilalanina y/o D-isómeros de aminoácidos. Como se plantea en este documento, en varias modalidades los aminoácidos no naturales o análogos de aminoácidos pueden incluir la supresión de uno o más aminoácidos de una secuencia.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico", utilizados de manera intercambiable en este documento, se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Estos términos incluyen, pero no están limitados a, ADN, ARN, ADNc (ADN complementario), ARNm (ARN mensajero), ARNr (ARN ribosómico), ARNsh (ARN de horquilla pequeño), ARNsn (ARN nuclear pequeño), ARNsno (ARN nucleolar corto), ARNmi (microARN), ADN genómico, ADN sintético, ARN sintético y/o ARNt.

El término "ADN desnudo" como se utiliza en este documento se refiere a ADN (por ejemplo, ADN libre de histona) que codifica una proteína tal como un DBDpp (por ejemplo, un CAR) es un ADN clonado en un vector de expresión adecuado en orientación apropiada para la expresión (por ejemplo, un plásmido). Los vectores virales los cuales se pueden utilizar incluyen pero no están limitados a vectores lentivirales SIN, vectores retrovirales, vectores de virus espumosos, vectores de adenovirus, vectores de virus adeno-asociados (AAV), vectores híbridos y/o transposones plasmídicos (por ejemplo, sistema de transposones Bella Durmiente) o sistemas de vectores basados en integrasa. Otros vectores que se pueden utilizar en relación con la elaboración y uso de DBDpp se describen en este documento o son conocidos de otra manera en el campo.

Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" como se utilizan en este documento se refieren al vehículo por medio del cual una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, una secuencia de codificación de DBDpp) se puede mantener o amplificar en una célula hospedante (por ejemplo, vector de clonación) o se puede introducir en una célula hospedante, con el fin de transformar el hospedante y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los vectores incluyen plásmidos, fagos, virus, etcétera.

Una "célula hospedante" incluye una célula individual o un cultivo de células el cual puede ser o ha sido un receptor

de ácidos nucleicos que codifican un DBDpp. Las células hospedantes incluyen pero no están limitadas a partículas virales, fagémidos, bacterias, levadura, plantas, animales y células de mamíferos. Las células hospedantes incluyen la progenie de una célula hospedante individual, y la progenie puede no ser necesariamente idéntica por completo (en morfología o en complemento de ADN total) a la célula precursora original debido a una mutación y/o cambio natural, accidental o deliberado. Una célula hospedante incluye células transfectadas o infectadas in vivo, in vitro o ex vivo con ácidos nucleicos que codifican un DBDpp. En algunos ejemplos, la célula hospedante tiene la capacidad de expresar y exhibir DBDpp sobre su superficie, tal como por ejemplo, en la presentación de fagos. "Expresión" incluye transcripción y/o traducción.

Una "colección" de DBDpp se refiere a una pluralidad de DBDpp únicos, y que incluye opcionalmente múltiples DBDpp que se unen al mismo objetivo, pero con sitios de unión y/o especificidades variados.

Una "colección de vectores" de DBDpp se refiere a una pluralidad de ácidos nucleicos únicos que codifican los DBDpp (como antes, que incluye opcionalmente ácidos nucleicos que codifican los DBDpp que se unen al mismo objetivo, pero con sitios de unión y/o especificidades variados).

Como se utiliza en este documento, los términos "soporte sólido", "soporte", "matrices" y "resinas" se utilizan de manera intercambiable y se refieren a, sin limitación, cualquier columna (o material de columna), cuenta, tubo de ensayo, placa de microtitulación, partícula sólida (por ejemplo, agarosa o sefarosa), microchip (por ejemplo, chip de silicio, silicio-vidrio u oro), o membrana (por ejemplo, membrana biológica o de filtro) al cual un DBDpp, anticuerpo u otra proteína se puede adherir (por ejemplo, se puede acoplar, vincular o adherir), ya sea directa o indirectamente (por ejemplo, a través de otros intermediarios asociados de unión, tales como otros anticuerpos o proteína A), o en los cuales un DBDpp o anticuerpo se puede incorporar (por ejemplo, a través de un receptor o canal). Los reactivos y las técnicas para adherir polipéptidos a soportes sólidos (por ejemplo, matrices, resinas, plástico, etcétera) son bien conocidos en el campo. Los soportes sólidos adecuados incluyen, pero no están limitados a, una resina o matriz cromatográfica (por ejemplo, cuentas de agarosa SEFAROSE-4 FF^{MR}), la pared o el piso de un pocillo en una placa de microtitulación de plástico, un biochip basado en sílice, poliacrilamida, agarosa, sílice, nitrocelulosa, papel, plástico, nilón, metal y combinaciones de los mismos. Los DBDpp y otras composiciones se pueden adherir sobre un material de soporte por medio de una asociación no covalente o por medio de la unión covalente, utilizando reactivos y técnicas conocidos en el campo. En una modalidad, el DBDpp se acopla a un material de cromatografía utilizando un conector.

Como se utiliza en este documento, los términos "farmacéuticamente aceptable" o "fisiológicamente tolerable" y variaciones gramaticales de los mismos, cuando se refieren a composiciones, portadores, diluyentes y reactivos, se utilizan de manera intercambiable y representan que los materiales tienen la capacidad de administración a o en un humano sin la producción de efectos fisiológicos indeseables terapéuticamente prohibitivos tales como náuseas, mareo, malestar gástrico y similares.

"Modular" significa el ajuste o regulación de la amplitud, frecuencia, grado o actividad. En otro aspecto relacionado, esta modulación puede ser modulada positivamente (por ejemplo, un incremento en la frecuencia, grado o actividad) o modulada negativamente (por ejemplo, una disminución en la frecuencia, grado o actividad). En varias modalidades, la modulación en una dirección positiva o negativa es referida en comparación con la función de la célula, tejido u órgano antes de la administración de un agente terapéutico. En modalidades adicionales, la modulación en una dirección positiva o negativa es referida con respecto a una célula, tejido u órgano saludable, normal.

Una "cantidad efectiva" de un DBDpp tal como una proteína de fusión de DBDpp como se proporciona en este documento es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito establecido específicamente tal como para producir un cambio observable en el nivel de una o más actividades biológicas relacionadas con el objetivo al cual se une el DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp). En ciertas modalidades, el cambio incrementa el nivel de actividad del objetivo. En otras modalidades, el cambio disminuye el nivel de actividad del objetivo. Una "cantidad efectiva" se puede determinar empíricamente y de una manera rutinaria, en relación con el propósito establecido. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un DBDpp tal como una proteína de fusión de DBDpp, u otro agente terapéutico efectivo para "tratar" (por ejemplo, reducir los síntomas de) una enfermedad o trastorno en un sujeto (mamífero). Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado.

"Paciente", "sujeto", "animal" y "mamífero" se utilizan de manera intercambiable y se refieren a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como también animales experimentales tales como conejos, ratas y ratones, y otros animales. Los animales incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como pollos, anfibios y reptiles. "Mamífero" como se utiliza en este documento se refiere a cualquier miembro de la clase Mammalia, que incluyen, sin limitación, humanos y primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores tales como ratones, ratas y cobayos, y similares. En una modalidad particular, el paciente es un humano. El término no indica una edad o sexo particular. De esta manera, se pretende que sujetos adultos y recién nacidos, así como también embriones y fetos, ya sea masculinos o femeninos, sean incluidos dentro del alcance de este término.

Los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando", como se utilizan en este documento se refieren a tanto el tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o disminuir la velocidad (reducir o retardar) los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de una enfermedad, condición o trastorno, aliviar los síntomas o detener o inhibir el desarrollo adicional de la enfermedad, condición o trastorno. El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retardar el comienzo de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o la supresión terapéutica o alivio de síntomas después de la manifestación de la enfermedad, condición o trastorno, condición patológica fijada como objetivo, prevenir la condición patológica, perseguir u obtener resultados benéficos o disminuir las probabilidades del desarrollo individual de la condición incluso si el tratamiento no es exitoso a fin de cuentas. Aquellos necesitados de tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la condición así como también aquellos propensos a tener la condición o aquellos en quienes se debe prevenir la condición. El tratamiento puede ser con una proteína de fusión de DBDpp sola o en combinación con un agente terapéutico adicional.

"Cáncer", "tumor" o "malignidad" se utilizan como sinónimos y se refieren a cualquiera de una variedad de enfermedades que se caracterizan por la proliferación anormal, descontrolada de células, la capacidad de células afectadas para esparcirse localmente o a través del torrente sanguíneo y sistema linfático a otras partes del cuerpo (metástasis), así como también cualquiera de una variedad de cualidades estructurales y/o moleculares características. "Tumor", como se utiliza en este documento, se refiere a todo el crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea malignas o benignas, y todas las células o tejidos pre-cancerosos y cancerosos. Un "tumor canceroso" o "tumor maligno" se entiende como una célula que tiene propiedades estructurales específicas, que carece de diferenciación y que tiene la capacidad de invasión y metástasis. Los cánceres que pueden ser tratados utilizando proteínas de fusión de DBDpp proporcionadas en este documento incluyen sin limitación cáncer de mama, pulmón, cerebro, huesos, hígado, riñones, colon, cabeza y cuello, ovarios, hematopoyético (por ejemplo, leucemia) y próstata. Otros tipos de cáncer y tumores que pueden ser tratados utilizando anticuerpos que contienen DBDpp se describen en este documento o de otra manera son conocidos en el campo.

Los términos antígeno tumoral o antígeno canceroso se utilizan de manera intercambiable en este documento. Los antígenos tumorales y cancerosos pueden ser un antígeno específico para tumores (TSA), antígenos específicos para cánceres (CSA), antígeno asociado con tumores (TAA) o antígenos asociados con cánceres (CAA). Un TSA es un antígeno que es único para células tumorales y no aparece en otras células en el cuerpo. Un TAA es un antígeno que se encuentra en tanto células tumorales como en algunas células normales. Debido a la naturaleza dinámica de los tumores, en algunos casos, las células tumorales pueden expresar antígenos únicos en ciertas etapas, y en otras también expresan antígenos que también son expresados en células no tumorales. De esta manera, la inclusión de un cierto marcador como un TAA no impide que sea considerado como un TSA. Los ejemplos de TAAs y TSAs que pueden ser unidos específicamente por un DBDpp incluyen pero no están limitados a: CD19, CD20, CD22, ROR 1, mesotelina, CD33/IL3Ra, cMet, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD2, NY-ESO- 1TCR, MAGE A3 TCR MART1, gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP1, TRP2, MAGE1, MAGE3, BAGE, GAGE1, GAGE2, pi5, CEA; p53, Ras, HER-2/neu; BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, 1GH-IGK, MYL-RAR; EBVA, antígenos de HPV E6 y E7, TSP-180, MAGE4, MAGE5, MAGE6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB3, nm-23H1, PSA, CA 19-9, CA72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-Catenina, CDK4, Mum-1, p15, p16, 43-9F, 5T4(791Tgp72) alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA125, CA 15-3/CA 27.29/BCAA, CA195, CA242, CA50, CAM43, CD68II, CO-029, FGF5, G250, Ga733VEpCAM, HTgp-175, M344, MA50, MG7-Ag, MOV 18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA90Mac-2, TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

El término "célula objetivo" como se utiliza en este documento se refiere a células las cuales están involucradas en una enfermedad y pueden ser fijadas como objetivo por composiciones que contienen DBDpp. Otras células objetivo incluyen cualquier célula en un sujeto (por ejemplo, un humano o animal) que puede ser fijada como objetivo por DBDpp de la invención. La célula objetivo puede ser una célula que expresa o sobreexpresa un objetivo unido específicamente por una proteína de fusión de DBDpp.

El término "células efectoras" son leucocitos los cuales expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan por lo menos el Fc(R)III y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos los cuales median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; en donde las PBMCs y las células NK se prefieren en ciertas modalidades. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMC como se describe en este documento o conocidas de otra manera en el campo. En una modalidad específica, las células efectoras son células efectoras de humano.

El término "función efectora" se refiere a una función inmune especializada de una célula diferenciada. Una función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser una actividad citolítica o una actividad auxiliar que incluye la secreción de citocinas.

Los términos "célula T" y "linfocito T" son intercambiables y se utilizan a manera de sinónimo en este documento. Los ejemplos incluyen pero no están limitados a células T nativas, células T de memoria central, células T de memoria efectora o combinaciones de las mismas.

El término "célula inmune" como se utiliza en este documento se refiere a células del sistema inmune de mamífero

que incluyen pero no están limitadas a células que presentan antígenos, células B, basófilos, células T citotóxicas, células dendríticas, eosinófilos, granulocitos, células T auxiliares, leucocitos, linfocitos, macrófagos, mastocitos, células de memoria, monocitos, células asesinas naturales, neutrófilos, fagocitos, células plasmáticas y células T.

- 5 El término "respuesta inmune", como se utiliza en este documento se refiere a inmunidades que incluyen pero no están limitadas a inmunidad innata, inmunidad humoral, inmunidad celular, inmunidad, respuesta inflamatoria, inmunidad adquirida (adaptativa), autoinmunidad y/o inmunidad hiperactiva.

- 10 El término "transducción" como se utiliza en este documento se refiere a la introducción de un ácido nucleico extraño en una célula utilizando un vector viral. La "transfección" como se utiliza en este documento se refiere a la introducción de un ácido nucleico extraño en una célula utilizando tecnología de ADN recombinante. El término "transformación" significa la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos (ADN o ARN) "extraños" (por ejemplo, extrínsecos, extracelulares o de otra manera no endógenos) a una célula hospedante, de modo que la célula hospedante expresará el ácido nucleico introducido para producir una sustancia deseada, tal como una proteína o enzima codificada por la secuencia de codificación introducida. La secuencia de ácidos nucleicos introducida también puede ser llamada un gen o secuencia "clonada" o "extraño", puede incluir secuencias reguladoras o de control, tales como secuencias de inicio, detención, promotoras, de señales, de secreción u otras secuencias utilizadas por la maquinaria genética de una célula. La secuencia de ácido nucleico puede incluir secuencias no funcionales o secuencias sin una función conocida. Una célula hospedante que recibe y expresa ácido nucleico introducido (por ejemplo, ADN o ARN) ha sido "transformada" y es un "transformante" o un "clon". El ADN o el ARN introducido a una célula hospedante puede venir de cualquier fuente, que incluye células del mismo género o especie que la célula hospedante, o células de un género o especie diferente o puede ser de origen no natural.

- 25 "Receptor de la superficie celular" se refiere a moléculas y complejos de moléculas con capacidad de recibir una señal y la transmisión de esta señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un receptor de la superficie celular proporcionado en este documento es un receptor de integrina activado, por ejemplo, un receptor de integrina $\alpha v \beta 3$ activado en una célula metastásica. Como se utiliza en este documento, "receptor de la superficie celular" también incluye una molécula expresada sobre la superficie de una célula que contiene un DBDpp con capacidad de unirse a un objetivo de interés. El término "receptor" indica una proteína asociada con una célula que se une a, o que interactúa de otra manera con, una molécula (por ejemplo, un ligando) y media el efecto del ligando sobre la célula. En varias modalidades, la molécula que interactúa con un receptor es una molécula bioactiva. Los receptores de la superficie celular unidos a la membrana se caracterizan por una estructura de múltiples dominios que comprende un dominio de unión a ligandos extracelular, un dominio que abarca la membrana y un dominio efector intracelular que está involucrado típicamente en la transducción de señales.

- 35 "Receptor antigénico quimérico" o "CAR" o "CARs" como se utiliza en este documento se refiere a receptores diseñados, los cuales injertan especificidad por antígenos u objetivos en las células (por ejemplo células T tales como células T nativas, células T de memoria central, células T de memoria efectora, células NK, células NKT o una combinación de las mismas). Los CARs también son conocidos como receptores de células T artificiales, receptores de células T quiméricos o inmunorreceptores quiméricos.

Polipéptidos de Dominio de Unión de Novo

- 45 Los términos "dominio de unión de novo" y DBD se utilizan de manera intercambiable en este documento para describir una secuencia de unión a objetivos que comparte cierta secuencia y ciertas cualidades estructurales de la secuencia de andamiaje de referencia: MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFEKEIAAFESLQAYKGKGPEVEALRKEAA AIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:1). Los términos polipéptidos de DBDpp y DBD incluyen referencias singulares (es decir, un polipéptido de DBD) y plurales (es decir, polipéptidos de DBD) a menos que se indique de otra manera explícitamente o por el contexto. 50 Un DBDpp es un polipéptido que puede unirse específicamente (de manera no aleatoria) a una molécula objetivo.

- Se ha descubierto, y se da a conocer en este documento en varias modalidades, que una agrupación de tres hélices anti-paralelas que no es de origen natural y sin objetivos (el solicitante no tiene conocimiento de un objetivo que se pueda unir) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:1 se puede utilizar como una plataforma de 55 andamiaje de referencia para producir polipéptidos (DBDpp) que contienen dominios de unión de novo (DBD) que se unen a un objetivo de interés y para crear colecciones de DBDpp las cuales se pueden examinar por DBDpp que tienen actividades funcionales y/o biológicas deseadas. Por consiguiente, en algunos aspectos, la descripción se refiere al uso de DBDpp, en métodos de producción de DBDpp que tienen propiedades deseadas tales como la capacidad para unirse a un objetivo de interés; métodos de producción de colecciones de DBDpp; las colecciones de DBDpp producidas por medio de estos métodos; métodos para examinar estas colecciones de DBDpp por actividades 60 biológicas deseadas; y los DBDpp identificados de estas colecciones.

- A menos que se indique de otra manera, la práctica de las composiciones y métodos dados a conocer emplea técnicas estándar de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes, cultivo de tejido y transformación de células), 65 microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, las cuales se encuentran dentro de la experiencia en el campo. Estas técnicas se realizan típicamente de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realizan

comúnmente utilizando o modificando de manera rutinaria procedimientos conocidos tales como aquellos expuestos en Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)); PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); Oligonucleotide Synthesis (Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (Freshney, ed., 1987); Handbook of Experimental Immunology (Weir y colaboradores, eds.; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller, ed., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, ed., 1987); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, ed., Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Mattila y colaboradores, Nucleic Acids Res. 19:967 (1991); Eckert y colaboradores, PCR Methods and Applications 1:17 (1991); PCR (McPherson, ed., IRL Press, Oxford); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, ed., 1994); Harlow, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988) y Kontermann, ed., "The Antibody Engineering Lab Manual" (Springer Verlag, Heidelberg/Nueva York, 2000); Current Protocols in Immunology (Coligan, ed., 1991); The Immunoassay Handbook (Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); y Methods of Immunological Analysis (Masseyeff, ed., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993); and Gennaro, y colaboradores 2000, Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 20ª Ed. Lipincott Williams and Wilkins: Baltimore, Md., o como se describe en este documento. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritos en este documento, son aquellos conocidos y utilizados en el campo. Adicionalmente, las técnicas estándar se pueden utilizar para la síntesis química, análisis químicos, producción recombinante, purificación, preparación farmacéutica, formulación, suministro y tratamiento de pacientes.

En una modalidad, el DBDpp no se deriva de un ligando celular natural de registro público (como de la presentación de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos, No. de Serie: 62/143,772, presentada el 6 de Abril de 2015 y de acuerdo con el conocimiento del solicitante). En otra modalidad, el DBDpp no se deriva de un dominio de unión a antígenos derivado de inmunoglobulina, u otro dominio de anticuerpo tal como una región constante, una región variable, una región determinante de la complementariedad (CDR), una región de armazón, un dominio Fc o una región bisagra. En otra modalidad, el DBDpp no contiene tres CDRs. En otra modalidad el DBDpp no contiene CDR1 y CDR2. En todavía otra modalidad, el DBDpp no contiene CDR1. En otra todavía modalidad, el DBDpp no contiene CDR2. En otra modalidad, el DBDpp no se deriva de la proteína A. En otra modalidad el DBDpp no se deriva de un receptor bacteriano natural. En otra modalidad el DBDpp no se deriva de fibronectina. En otra modalidad el DBDpp no se deriva del dominio de fibronectina tipo III. En todavía otra modalidad, el DBDpp no se deriva de una proteína knottin. En todavía otra modalidad, el DBDpp no se deriva de una lipocalina. En todavía otra modalidad, el DBDpp no se deriva de un aficuerpo.

Características de secuencia

Como se indicó anteriormente, el polipéptido de andamiaje de referencia de la SEQ ID NO:1 contiene tres hélices alfa anti-paralelas y es una variante de una secuencia de polipéptidos que no es de origen natural y sin objetivos diseñada originalmente como un ejercicio en el plegamiento de proteínas. En este documento se proporcionan DBDpp que contienen ciertas modificaciones de residuos de aminoácidos en la secuencia del polipéptido de andamiaje de referencia de la SEQ TD NO:1 que confieren la capacidad del DBDpp para unirse a un objetivo de interés y el uso del DBDpp como un agente de unión a objetivos y fijación de objetivos.

En una modalidad, un DBDpp individual tiene una longitud de aproximadamente 65 a 150 aminoácidos, de aproximadamente 65 a 125 aminoácidos, de aproximadamente 65 a 100 aminoácidos, de aproximadamente 65 a 90 aminoácidos, de aproximadamente 65 a 80 aminoácidos, de aproximadamente 65 a 70 aminoácidos. También se contempla en algunas modalidades que el DBDpp tenga una longitud de aproximadamente 75 a 150 aminoácidos, de aproximadamente 75 a 125 aminoácidos, de aproximadamente 75 a 100 aminoácidos, de aproximadamente 75 a 90 aminoácidos, de aproximadamente 75 a 80 aminoácidos. El DBDpp puede ser desnudo o puede ser codificado con otras moléculas, que incluyen pero no están limitadas a, toxinas y radioisótopos. En modalidades aún adicionales, los DBDpp más largos se emplean, por ejemplo DBDpp que varían en su longitud de aproximadamente 150 a aproximadamente 160 aminoácidos, de aproximadamente 160 a aproximadamente 170 aminoácidos, de aproximadamente 170 a aproximadamente 180 aminoácidos, de aproximadamente 180 a aproximadamente 190 aminoácidos, de aproximadamente 190 a aproximadamente 200 aminoácidos o cualquier longitud entre aquellas listadas (incluyendo puntos finales).

Para proteínas de unión conocidas, los residuos específicos que constituyen la región de unión de la molécula ya sea han sido (o teóricamente pueden ser) determinados experimentalmente. Las proteínas de unión naturales (por ejemplo anticuerpos o proteína A) tienen residuos identificables que promueven la unión a sus objetivos conocidos. Sin embargo, a diferencia de los ligandos naturales y las proteínas de unión, la proteína designada $\alpha 3d$ (SEQ ID NO:49) o la secuencia de andamiaje de referencia de la SEQ ID NO:1 no se sabe que se unan específicamente a otra proteína (por ejemplo, un objetivo). Por lo tanto los residuos de unión endógenos no se pueden utilizar como una guía para diseñar una especificidad de unión novedosa. En la construcción del DBDpp que se une a objetivos, los residuos se consideraron para la mutación (por ejemplo, aleatorización dentro de la colección) si fueron expuestos a la superficie - que exhibían accesibilidad para solventes significativa. La accesibilidad relativa de un residuo dentro del dominio (área D) en comparación con el estado aislado (área I) se representa como un valor de porcentaje (% de A). Los residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 que tienen valores de % de A menores que aproximadamente 10% a

11% (por ejemplo, residuos que corresponden a F7, L11, I14, L18, L21, S24, L28, F31, I35, F38, L42, Y45, G49, V53, L56, A60, I63 y L67, de la SEQ ID NO:1), se cree que son inaccesibles para el solvente exterior y se considera que son residuos de núcleo interiores de la estructura de la SEQ ID NO:1. Por el contrario, los residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 con valores de % de A que son mayores que aproximadamente 10% a 11% se cree que ocupan posiciones que tienen mayor potencial para la interacción con un objetivo de interés. Las superficies de unión de proteínas están compuestas típicamente de varios residuos de aminoácidos que son ya sea adyacentes o están en proximidad estrecha, entre sí en un espacio tridimensional. Por lo tanto, una consideración secundaria en la construcción de colecciones, de acuerdo con varias modalidades descritas en este documento, fue la proximidad relativa de esos residuos seleccionados dentro de la estructura secundaria y terciaria predicha del DBDpp.

La estructura secundaria de proteínas tales como hélices alfa puede cambiar dependiendo de variables ambientales tales como temperatura, matriz o composición y concentración del amortiguador. Se predice que las estructuras secundarias de hélices alfa de la secuencia de polipéptidos de referencia de la SEQ ID NO:1 están compuestas de los residuos G2-A20 para la hélice 1, los residuos L28-A44 para la hélice 2 y los residuos E52-Y70 para la hélice 3. En ejemplos adicionales, se predice que las estructuras secundarias de hélices alfa de la secuencia de polipéptidos de referencia de la SEQ ID NO:1 están compuestas de los residuos W4-L21 para la hélice 1, los residuos E25-Y45 para la hélice 2 y los residuos P51-Y70 para la hélice 3. Las posiciones de aminoácidos del andamiaje de referencia que corresponde a los residuos de hélices alfa con baja accesibilidad para solventes son: F7, L11, I14, L18, L21, L28, F31, I35, F38, L42, Y45, V53, L56, A60, I63 y L67 de la SEQ ID NO:1. Las posiciones de aminoácidos del andamiaje de referencia que corresponde a residuos de hélices alfa, accesibles para solventes son: G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69 e Y70 de la SEQ ID NO:1. Las posiciones de aminoácidos del andamiaje de referencia que corresponden a los residuos no hélices alfa son las siguientes: M1, G22, G23, S24, E25, A26, E27, K46, G47, K48, G49, N50, P51, R71, H72 y N73 de la SEQ ID NO:1.

En una modalidad, los DBDpp se definen como polipéptidos de unión a objetivos compuestos de la SEQ ID NO:1 con una o más sustituciones de aminoácidos como se define en la reivindicación 18. En una modalidad, un alineamiento de secuencias del DBDpp con la SEQ ID NO:1 revelaría una identidad entre secuencias mayor que 90%. En otras modalidades, un alineamiento de secuencias del DBDpp con la SEQ ID NO:1 revelaría una identidad entre secuencias mayor que 80%. En otras modalidades, un alineamiento de secuencias del DBDpp con la SEQ ID NO:1 revelaría una identidad entre secuencias mayor que 70%. En otras modalidades, un alineamiento de secuencias del DBDpp con la SEQ ID NO:1 revelaría una identidad entre secuencias mayor que 60%. En otras modalidades, un alineamiento de secuencias del DBDpp con la SEQ ID NO:1 revelaría una identidad entre secuencias mayor que 50%.

En algunas modalidades, los residuos de DBDpp con valores de % de A que son menores que 10% permanecerían constantes, o serían sustituidos por un cambio de aminoácido conservado. En modalidades particulares, el DBDpp de residuos accesibles para solventes (es decir, % de A mayor que 10) tiene una secuencia de aminoácidos que se sujeta a la mutagénesis modificada se ubicaría dentro de regiones del polipéptido asociado con una estructura secundaria de hélices alfa. Las posiciones de hélices alfa de la secuencia de la SEQ ID NO:1 que tiene residuos inaccesibles para solventes corresponden a F7, L11, I14, L18, L21, L28, F31, I35, F38, L42, Y45, V53, L56, A60, I63 y L67, de la SEQ ID NO:1. Las sustituciones de aminoácidos en esas posiciones son preferiblemente de naturaleza conservadora y pueden incluir aminoácidos no convencionales o no naturales. En algunas modalidades, la selección de sustituciones de aminoácidos naturales incluye L, I, V, A y F (y W, Y, M). En algunos DBDpp, los residuos inaccesibles para solventes de un DBD contenido en un DBDpp son más de 60%, 70%, 80% o 90%, o son 100% idénticos a los residuos correspondientes en la SEQ ID NO:1. F7, L11, I14, L18, L21, L28, F31, I35, F38, L42, Y45, V53, L56, A60, I63 y L67, de la SEQ ID NO:1.

En una modalidad, un DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 en donde un total de 5 a 25 o de 5 a 30 residuos de aminoácidos han sido modificados; y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. Los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones. En otra modalidad, de 5 a 25 o de 5 a 30 de los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones conservadoras. En otra modalidad, de 5 a 25 o de 5 a 30 de los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones no conservadoras. En un ejemplo adicional, de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos son sustituciones conservadoras y de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos son sustituciones no conservadoras. En modalidades adicionales, de 1 a 25 o de 1 a 30 de las sustituciones son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de: M1, G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, L21, G22, G23, S24, E25, A26, E27, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, Y45, K46, G47, K48, G49, N50, P51, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69, Y70, R71, H72 y N73. En modalidades adicionales, de 1 a 25 o de 1 a 30 de las sustituciones son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de: M1, G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, G22, G23, S24, E25, A26, E27, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, K46, G47, K48, G49, N50, P51, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69, Y70, R71, H72 y N73. En una modalidad adicional, de 1 a 20 o de 1 a 30 de las sustituciones son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de: G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66,

Q68, A69 e Y70. En un ejemplo adicional opcional, el DBDpp comprende opcionalmente además una secuencia de aminoácidos en donde de 1 a 5, de 1 a 10, de 1 a 15, de 5 a 10 o 5 a 15 de los residuos que corresponden a los residuos inaccesibles para solventes de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En un ejemplo opcional adicional, los residuos sustituidos que corresponden a un residuo inaccesible para solventes de la SEQ ID NO:1 se seleccionan del grupo que consiste de: F7, L11, I14, L18, L28, F31, I35, F38, L42, V53, L56, A60, I63, y L67, e Y70. En algunos ejemplos, los residuos sustituidos que corresponden a un residuo inaccesible para solventes de la SEQ ID NO:1 se seleccionan del grupo que consiste de: F7, L11, I14, L18, L21, L28, F31, I35, F38, L42, Y45, V53, L56, A60, I63 y L67, e Y70. En una modalidad adicional, el DBDpp es una proteína de fusión. En un ejemplo descrito, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En un ejemplo adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina y una agarosa. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En otra modalidad, el DBDpp se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes (que incluyen partículas virales) que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En algunas modalidades, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En modalidades adicionales, la célula hospedante es un procariota o un eucariota que expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es una célula inmune de humano que expresa una proteína de fusión de DBDpp sobre su superficie. También se proporcionan colecciones que comprenden una pluralidad de DBDpp.

En una modalidad, un DBDpp aislado comprende una variación de secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 en donde de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 residuos de aminoácidos accesibles para solventes de la SEQ ID NO:1 son sustituidos, y en donde de 1 a 5, de 1 a 10, de 1 a 15, de 5 a 10 o de 5 a 15 residuos inaccesibles para solventes de la SEQ ID NO:1 son sustituidos opcionalmente por una sustitución de aminoácido conservadora, y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En algunas modalidades, los residuos de aminoácidos accesibles para solventes sustituidos de la SEQ ID NO:1 tienen un % de A mayor que 10. En algunas modalidades, los residuos de aminoácidos inaccesibles para solventes sustituidos de la SEQ ID NO:1 tienen un % de A menor que 10. En una modalidad, los residuos de aminoácidos accesibles para solventes sustituidos de la SEQ ID NO:1 se seleccionan del grupo que consiste de: G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69 e Y70. En algunas modalidades, por lo menos 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos. En algunas modalidades, por lo menos 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, por lo menos 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos no conservadoras. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos no contienen prolina. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos no contienen cisteína o prolina. En algunas modalidades, las sustituciones de residuos de aminoácidos no incluyen más de una cisteína. En algunas modalidades, de 1 a 5, de 1 a 10, de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25 o de 5 a 30 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos. En algunos ejemplos, de 5 a 41, de 10 a 41, de 15 a 41, de 20 a 41, de 25 a 41, de 30 a 41 o de 35 a 41 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos. En algunos ejemplos, de 5 a 35 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 5 a 35 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras, o de 5 a 25 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 5 a 25 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras. En un ejemplo adicional opcional, el DBDpp comprende opcionalmente además una secuencia de aminoácidos en donde de 1 a 5, de 1 a 10, de 1 a 15, de 5 a 10 o 5 a 15 de los residuos que corresponden a los residuos inaccesibles para solventes de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En una modalidad opcional adicional, los residuos sustituidos que corresponden a un residuo inaccesible para solventes de la SEQ ID NO:1 se seleccionan del grupo que consiste de: F7, L11, I14, L18, L28, F31, I35, F38, L42, V53, L56, A60, I63 y L67, e Y70. En un ejemplo opcional adicional, los residuos sustituidos que corresponden a un residuo inaccesible para solventes de la SEQ ID NO:1 se seleccionan del grupo que consiste de: F7, L11, I14, L18, L21, L28, F31, I35, F38, L42, Y45, V53, L56, A60, I63 y L67, e Y70. En un ejemplo adicional, el DBDpp es una proteína de fusión. En un ejemplo, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En un ejemplo adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina y una agarosa. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En otra modalidad, el DBDpp

se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes (que incluyen partículas virales) que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En algunas modalidades, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En modalidades adicionales, la célula hospedante es un procarionte o un eucariote que expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es una célula inmune de humano que expresa una proteína de fusión de DBDpp sobre su superficie. También se proporcionan colecciones que comprenden una pluralidad de DBDpp.

El término "bucle" se refiere a secuencias en el DBD que corresponden al bucle localizado entre, por ejemplo, la hélice 1 y la hélice 2 de la SEQ ID NO:1 de andamiaje de referencia (por ejemplo, posiciones 22-24 de las SEC ID NOS: 2-6, y Z₁ de las SEQ ID NOS: 7-11) y/o el bucle localizado entre la hélice 2 y la hélice 3 de la SEQ ID NO:1 de andamiaje de referencia por ejemplo las posiciones 46-48 de las SEC ID NOS: 2-6 y Z₂ de las SEQ ID NOS: 7-11). En modalidades particulares, uno o ambos bucles Z₁ y Z₂ son secuencias de aminoácidos que consisten de 2 a 5, de 2 a 10, de 2 a 15, de 2 a 20, de 2 a 25 o de 2 a 30 residuos de aminoácidos (incluyendo puntos finales y cualquier número entre aquellos listados). En algunas modalidades, uno o ambos bucles Z₁ y Z₂ son secuencias de aminoácidos que consisten de 1, 2, 3, 4, 5, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más de 20 residuos de aminoácidos (incluyendo puntos finales y cualquier número entre aquellos listados). En una modalidad adicional, por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de los residuos de aminoácidos del bucle Z₁ y/o Z₂ son glicina o serina. En modalidades adicionales, por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de los residuos de aminoácidos del bucle Z₁ y/o Z₂ se seleccionan del grupo que consiste de glicina, serina, treonina, alanina, prolina, histidina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, lisina y arginina. En una modalidad el bucle Z₁ tiene la secuencia de aminoácidos GGS. En una modalidad el bucle Z₂ tiene la secuencia de aminoácidos KGKG.

En una modalidad, un DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos de MGSW₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKG KGNPE VEALRKEAAAI₅₀RDELQAYRHN (SEQ ID NO:2), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₃₀, X₃₃, X₃₄, X₃₇, X₄₀, X₄₁ y X₄₄, son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. El DBDpp no contiene la secuencia de aminoácidos LAAIKTRLQ (SEQ ID NO:50). En una modalidad adicional, el DBDpp es una proteína de fusión. En algunas modalidades, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos sustituidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos anteriores de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos no conservadoras. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos no contienen prolina. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos no contienen cisteína. En algunas modalidades, ni prolina ni cisteína están incluidas en las sustituciones de aminoácidos. En algunas modalidades, las sustituciones de residuos de aminoácidos no incluyen más de una cisteína. En algunas modalidades, de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras, o de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras. En otra modalidad, el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En una modalidad adicional, se describe una colección que contiene una pluralidad de DBDpp. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes (que incluyen partículas virales) que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En algunas modalidades, la célula hospedante es un procarionte o un eucariote que expresan el DBDpp sobre su superficie. En algunas modalidades, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es una célula inmune de humano que expresa una proteína de fusión de DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En una modalidad adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina y una agarosa.

En una modalidad, el DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos de MGSWAEFKQRLAAIKTRL₁LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKKGKGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3), en donde X₃₂, X₃₃, X₃₆, X₃₉, X₄₀, X₄₃, X₅₇, X₅₈, X₆₁, X₆₄, X₆₅ y X₆₈, son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. El DBDpp no contiene la secuencia de aminoácidos LAAIKTRLQ (SEQ ID NO:50). En una modalidad adicional, el DBDpp es una proteína de fusión. En algunas modalidades, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos sustituidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con

sustituciones de residuos de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos anteriores de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos no conservadoras. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos no contienen prolina. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos no contienen cisteína. En algunas modalidades, ni prolina ni cisteína están incluidas en las sustituciones de aminoácidos. En algunas modalidades, las sustituciones de residuos de aminoácidos no incluyen más de una cisteína. En algunas modalidades, de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras, o de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras. En otra modalidad, el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, se proporciona una colección que contiene una pluralidad de DBDpp. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes (que incluyen partículas virales) que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En algunas modalidades, la célula hospedante es un procariota o un eucariota que expresa el DBDpp sobre su superficie. En algunas modalidades, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es una célula inmune de humano que expresa una proteína de fusión de DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En un ejemplo adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina y una agarosa.

En una modalidad, el DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos de MGSWX₅EFX₈RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESLQAYKKGKNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₅₅, X₅₈, X₅₉, X₆₂, X₆₅ y X₆₆ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. En una modalidad particular, el DBDpp no contiene la secuencia de aminoácidos LAAIKTRLQ (SEQ ID NO:50). En una modalidad adicional, el DBDpp es una proteína de fusión. En algunas modalidades, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos sustituidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos anteriores de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos no conservadoras. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos no contienen prolina. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos no contienen cisteína. En algunas modalidades, ni prolina ni cisteína están incluidas en las sustituciones de aminoácidos. En algunas modalidades, las sustituciones de residuos de aminoácidos no incluyen más de una cisteína. En algunas modalidades, de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras, o de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras. En otra modalidad, el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, se proporciona una colección que contiene una pluralidad de DBDpp. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes (que incluyen partículas virales) que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En algunas modalidades, la célula hospedante es un procariota o un eucariota que expresa el DBDpp sobre su superficie. En algunas modalidades, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es una célula inmune de humano que expresa una proteína de fusión de DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En un ejemplo adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina y una agarosa.

En una modalidad, el DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos de MGSWX₅FKX₉X₁₀LAX₁₃KX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKKGKNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₃₂, X₃₃, X₃₆, X₃₉, X₄₀, X₄₃, X₅₅, X₅₈, X₅₉, X₆₂, X₆₅ y X₆₆, son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. El DBDpp no contiene la

secuencia de aminoácidos LAAIKTRLQ (SEQ ID NO:50). En una modalidad adicional, el DBDpp es una proteína de fusión. En algunas modalidades, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos sustituidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos anteriores de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos no conservadoras. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos no contienen prolina. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos no contienen cisteína. En algunas modalidades, ni prolina ni cisteína están incluidas en las sustituciones de aminoácidos. En algunas modalidades, las sustituciones de residuos de aminoácidos no incluyen más de una cisteína. En algunas modalidades, de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras. En otra modalidad, el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, se proporciona una colección que contiene una pluralidad de DBDpp. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes (que incluyen partículas virales) que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En algunas modalidades, la célula hospedante es un procariota o un eucariota que expresa el DBDpp sobre su superficie. En algunas modalidades, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es una célula inmune de humano que expresa una proteína de fusión de DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En un ejemplo adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina y una agarosa.

En una modalidad, el DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos de MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEALAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKGGKNPEVEA LX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRH (SEQ ID NO:6), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₃₀, X₃₃, X₃₄, X₃₇, X₄₀, X₄₁, X₄₄, X₅₇, X₅₈, X₆₁, X₆₄, X₆₅ y X₆₈ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En una modalidad adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. El DBDpp no contiene la secuencia de aminoácidos LAAIKTRLQ (SEQ ID NO:50). En una modalidad adicional, el DBDpp es una proteína de fusión. En algunas modalidades, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos sustituidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos anteriores de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos no conservadoras. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos no contienen prolina. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos no contienen cisteína. En algunas modalidades, ni prolina ni cisteína están incluidas en las sustituciones de aminoácidos. En algunas modalidades, las sustituciones de residuos de aminoácidos no incluyen más de una cisteína. En algunas modalidades, de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras. En otra modalidad, el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En una modalidad adicional, el DBDpp se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En una modalidad adicional, se proporciona una colección que contiene una pluralidad de DBDpp. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes (que incluyen partículas virales) que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En algunas modalidades, la célula hospedante es un procariota o un eucariota que expresa el DBDpp sobre su superficie. En algunas modalidades, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es una célula inmune de humano que expresa una proteína de fusión de DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En un ejemplo adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina y una agarosa.

También se describe un DBDpp aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de: MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃KX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPE VEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:7), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₂₈, X₃₁, X₃₂, X₃₅, X₃₈, X₃₉ y X₄₂, son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, en donde Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales

y/o no naturales, y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. En un ejemplo particular, el DBDpp no contiene la secuencia de aminoácidos LAAIKTRLQ (SEQ ID NO:50). En una modalidad adicional, el DBDpp es una proteína de fusión. En algunos ejemplos, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos sustituidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos anteriores de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos no conservadoras. En algunos ejemplos, las sustituciones de aminoácidos no contienen prolina. En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos no contienen cisteína. En algunas modalidades, ni prolina ni cisteína están incluidas en las sustituciones de aminoácidos. En algunos ejemplos, las sustituciones de residuos de aminoácidos no incluyen más de una cisteína. En algunos ejemplos, de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras, o de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras. En otro ejemplo, el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, el DBDpp se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, el DBDpp se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, se proporciona una colección que contiene una pluralidad de DBDpp. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes (que incluyen partículas virales) que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En algunos ejemplos, la célula hospedante es un procariota o un eucariota que expresa el DBDpp sobre su superficie. En algunos ejemplos, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, la célula hospedante es una célula inmune de humano que expresa una proteína de fusión de DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En un ejemplo adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina y una agarosa.

También se describe un DBDpp aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de: MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:8), en donde X_{30} , X_{31} , X_{34} , X_{37} , X_{38} , X_{41} , X_{52} , X_{53} , X_{56} , X_{59} , X_{60} y X_{63} son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, en donde Z_1 y Z_2 son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales, y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. En un ejemplo particular, el DBDpp no contiene la secuencia de aminoácidos LAAIKTRLQ (SEQ ID NO:50). En un ejemplo adicional, el DBDpp es una proteína de fusión. En algunos ejemplos, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos sustituidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos conservadoras. En algunos ejemplos, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos anteriores de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos no conservadoras. En algunos ejemplos, las sustituciones de aminoácidos no contienen prolina. En algunos ejemplos, las sustituciones de aminoácidos no contienen cisteína. En algunos ejemplos, ni prolina ni cisteína están incluidas en las sustituciones de aminoácidos. En algunos ejemplos, las sustituciones de residuos de aminoácidos no incluyen más de una cisteína. En algunos ejemplos, de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras, o de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras. En un ejemplo, el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, el DBDpp se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, el DBDpp se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, se proporciona una colección que contiene una pluralidad de DBDpp. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes (que incluyen partículas virales) que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En un ejemplo, la célula hospedante es un procariota o un eucariota que expresa el DBDpp sobre su superficie. En algunos ejemplos, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, la célula hospedante es una célula inmune de humano que expresa una proteína de fusión de DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En un ejemplo adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina y una agarosa.

También se proporciona un DBDpp aislado que comprende una secuencia de aminoácidos

MGSWX₅FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEV

EX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₃₀, X₃₁, X₃₄, X₃₇, X₃₈, X₄₁, X₅₀, X₅₃, X₅₄, X₅₇, X₆₀ y X₆₁ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, en donde Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales, y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. En un ejemplo particular, el DBDpp no contiene la secuencia de aminoácidos LAAIKTRLQ (SEQ ID NO:50). En un ejemplo adicional, el DBDpp es una proteína de fusión. En algunos ejemplos, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos sustituidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos conservadoras. En algunos ejemplos, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos anteriores de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos no conservadoras. En algunos ejemplos, las sustituciones de aminoácidos no contienen prolina. En algunos ejemplos, las sustituciones de aminoácidos no contienen cisteína. En algunas modalidades, ni prolina ni cisteína están incluidas en las sustituciones de aminoácidos. En algunos ejemplos, las sustituciones de residuos de aminoácidos no incluyen más de una cisteína. En algunos ejemplos, de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras, o de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras. En un ejemplo, el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, el DBDpp se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, el DBDpp se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, se proporciona una colección que contiene una pluralidad de DBDpp. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes (que incluyen partículas virales) que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En algunos ejemplos, la célula hospedante es un procarionte o un eucariota que expresa el DBDpp sobre su superficie. En algunos ejemplos, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, la célula hospedante es una célula inmune de humano que expresa una proteína de fusión de DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En un ejemplo adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina y una agarosa.

También se proporciona un DBDpp aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPE VEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₂₈, X₃₁, X₃₂, X₃₅, X₃₈, X₃₉, X₄₂, X₅₂, X₅₃, X₅₆, X₅₉, X₆₀ y X₆₃ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, en donde Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. En un ejemplo particular, el DBDpp no contiene la secuencia de aminoácidos LAAIKTRLQ (SEQ ID NO:50). En un ejemplo adicional, el DBDpp es una proteína de fusión. En algunos ejemplos, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos sustituidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos conservadoras. En algunos ejemplos, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los residuos de aminoácidos anteriores de la SEQ ID NO:1 son sustituidos con sustituciones de residuos de aminoácidos no conservadoras. En algunos ejemplos, las sustituciones de aminoácidos no contienen prolina. En algunos ejemplos, las sustituciones de aminoácidos no contienen cisteína. En algunos ejemplos, ni prolina ni cisteína están incluidas en las sustituciones de aminoácidos. En algunos ejemplos, las sustituciones de residuos de aminoácidos no incluyen más de una cisteína. En algunos ejemplos, de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 1 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras, o de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones conservadoras y de 5 a 12 de los residuos de aminoácidos accesibles para solventes son sustituidos con sustituciones no conservadoras. En otro ejemplo, el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, el DBDpp se une específicamente a una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, el DBDpp se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, se proporciona una colección que contiene una pluralidad de DBDpp. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp y vectores que contienen los ácidos nucleicos. También se proporcionan células hospedantes (que incluyen partículas virales) que contienen los ácidos nucleicos y vectores. En algunos ejemplos, la célula hospedante es un procarionte o un eucariota que expresa el DBDpp sobre su superficie. En algunos ejemplos, la célula hospedante expresa el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, la célula hospedante es un fago que expresa el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, la célula hospedante es una célula inmune de humano que expresa una proteína de fusión de DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo, el DBDpp se adhiere a un soporte sólido. En un

ejemplo adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste de: una cuenta, un portaobjetos, un chip, una gelatina y una agarosa.

En algunas modalidades, el DBDpp comprende una sustitución en una posición correspondiente en la secuencia de la SEQ ID NO:1 seleccionada del grupo que consiste de: G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69 e Y70. En modalidades adicionales, el DBDpp comprende sustituciones de por lo menos 1, 5, 10, 15, 20 o 30 de las posiciones anteriores en la secuencia de la SEQ ID NO:1. Estas sustituciones pueden ser conservadoras, no conservadoras o una mezcla de sustituciones conservadoras y no conservadoras. En algunas modalidades, las sustituciones no incluyen la adición de una prolina o cisteína. En algunas modalidades, las sustituciones no incluyen más de una cisteína individual. En algunos DBDpp, estos residuos pueden ser más de 90% idénticos a la SEQ ID NO:1. En otros DBDpp, estos residuos pueden ser más de 80% idénticos a la SEQ ID NO:1. En otros DBDpp, estos residuos pueden ser más de 70% idénticos a la SEQ ID NO:1. En otros DBDpp, estos residuos pueden ser más de 60% idénticos a la SEQ ID NO:1. En otros DBDpp, estos residuos pueden ser más de 50% idénticos a la SEQ ID NO:1. En otros DBDpp, estos residuos pueden ser más de 40% idénticos a la SEQ ID NO:1. En otros DBDpp, estos residuos pueden ser más de 30% idénticos a la SEQ ID NO:1. En otros DBDpp, estos residuos son más de 20% idénticos a la SEQ ID NO:1. En otros DBDpp, estos residuos son más de 10% idénticos a la SEQ ID NO:1.

En algunas modalidades, el DBDpp comprende una sustitución en una posición en la secuencia de la SEQ ID NO:1 seleccionada del grupo que consiste de: M1, L21, G22, G23, S24, E25, A26, E27, Y45, K46, G47, K48, G49, N50, P51, R71, H72 y N73.

En este documento se describen adicionalmente DBDpp en los cuales residuos de aminoácidos han sido suprimidos de la terminal amino, la terminal carboxi o tanto la terminal amino como la terminal carboxi de la secuencia que corresponde a la SEQ ID NO:1. En algunos ejemplos el DBDpp contiene una secuencia con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de aminoácidos suprimidos de la terminal amino de la secuencia de DBDpp que corresponde a la secuencia de la SEQ ID NO:1. En algunos ejemplos el DBDpp contiene una secuencia con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de aminoácidos suprimidos de la terminal carboxi de la secuencia de DBDpp que corresponde a la secuencia de la SEQ ID NO:1. En algunos ejemplos el DBDpp contiene una secuencia con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 11 o 12 residuos de aminoácidos suprimidos de la terminal amino de la secuencia que corresponde a la SEC ID NO:1 y una secuencia con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de aminoácidos suprimidos de la terminal carboxi que corresponden a la secuencia de la SEQ ID NO:1. En algunos ejemplos, el DBDpp contiene una secuencia con 1-5, 1-10 o de 1 a 15 residuos de aminoácidos suprimidos de la terminal carboxi de la secuencia que corresponde a la SEQ ID NO:1. En algunos ejemplos el DBDpp contiene una secuencia con 1-5, 1-10 o de 1 a 15 residuos de aminoácidos suprimidos de la terminal amino de la secuencia que corresponde a la SEQ ID NO:1 y una secuencia con 1-5, 1-10 o de 1 a 15 residuos de aminoácidos suprimidos de la terminal carboxi de la secuencia que corresponde a la SEQ ID NO:1.

En algunos ejemplos, el DBDpp contiene una secuencia que difiere de la secuencia correspondiente en referencia a la SEQ ID NO:1 en 2 o más categorías de modificaciones de secuencia (es decir, sustituciones, supresiones, inserciones y adiciones). Por ejemplo el DBDpp puede incluir combinaciones de supresiones, inserciones y sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia correspondiente en la secuencia de polipéptidos de referencia. En algunos ejemplos el DBDpp contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 supresiones de aminoácidos dentro de la secuencia de referencia mostrada en la SEQ ID NO:1. En algunos ejemplos el DBDpp contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 inserciones de aminoácidos dentro de la secuencia de referencia mostrada en la SEQ ID NO:1.

Los DBDpp se Unen a Objetivos de Interés

El DBDpp se une a un objetivo de interés. En varias modalidades, el DBDpp no tiene un impacto discernible sobre la función del objetivo. Alternativamente, en varias modalidades, los DBDpp pueden unirse a un objetivo de interés y pueden inhibir, antagonizar, agonizar, bloquear, incrementar, estimular o interferir completa o parcialmente con la actividad biológica de ese objetivo. La unión puede ser identificada como agonista o antagonista y se puede determinar utilizando o modificando de manera rutinaria ensayos, bioensayos y/o modelos animales conocidos en el campo para evaluar esta actividad.

Un agonista de DBDpp se refiere a un DBDpp que de alguna manera incrementa o mejora la actividad biológica del objetivo del DBDpp o tiene una actividad biológica comparable a un agonista conocido del objetivo del DBDpp. En otra modalidad, el DBDpp es un antagonista del objetivo al cual se une. Un antagonista de DBDpp se refiere a un DBDpp que bloquea completa o parcialmente o interfiere de alguna manera con la actividad biológica de la proteína objetivo del DBDpp o tiene una actividad biológica comparable a un antagonista o inhibidor conocido de la proteína objetivo del DBDpp.

Expresiones como "afinidad de unión para un objetivo", "unión a un objetivo" y similares se refieren a una propiedad de un polipéptido la cual se puede medir directamente a través de la determinación de las constantes de afinidad, por ejemplo, la cantidad de DBDpp que se asocia y disocia a una concentración determinada de antígeno. Se pueden

utilizar diferentes métodos para caracterizar la interacción molecular, tales como, pero no limitados a, análisis de competencia, análisis de equilibrio y análisis microcalorimétrico, y análisis de interacción en tiempo real basado en la interacción de resonancia de plasmones de la superficie (por ejemplo utilizando un instrumento Biacore^{MR}). Estos métodos son bien conocidos para la persona experta y se describen, por ejemplo, en Neri D y colaboradores (1996) Tibtech 14:465-470 y Jansson M y colaboradores (1997) J Biol Chem 272:8189-8197.

Los requerimientos de afinidad para un evento de unión de DBDpp determinado son fortuitos en una variedad de factores que incluyen, pero no están limitados a: la composición y la complejidad de la matriz de unión, la valencia y la densidad de las moléculas tanto de DBDpp como objetivo, y la aplicación funcional del DBDpp. En una modalidad, el DBDpp se une a un objetivo de interés con una constante de disociación (KD) menor que o igual a 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M o 10^{-5} M. En una modalidad adicional, un DBDpp se une a un objetivo de interés con una KD menor que o igual a 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M o 10^{-8} M. En modalidades adicionales, un DBDpp se une a un objetivo de interés con una KD menor que o igual a 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M. En varias modalidades, los DBDpp generados por medio de los métodos dados a conocer en este documento tienen una constante de disociación seleccionada del grupo que consiste de entre 10^{-4} M y 10^{-5} M, entre 10^{-5} M y 10^{-6} M, entre 10^{-6} M y 10^{-7} M, entre 10^{-7} M y 10^{-8} M, entre 10^{-8} M y 10^{-9} M, entre 10^{-9} M y 10^{-10} M, entre 10^{-10} M y 10^{-11} M y entre 10^{-11} M y 10^{-12} M.

En una modalidad un DBDpp se une a un objetivo de interés en forma activa. En una modalidad un DBDpp se une de manera reversible a un objetivo de interés en forma activa y también libera el objetivo unido en forma activa. En una modalidad un DBDpp se une a un objetivo de interés en la forma nativa. En modalidades específicas, el DBDpp se une a objetivos de interés con constantes de disgregación o $K_{\text{disgregación}}$ mayores que o iguales a $10^{-10} \text{ seg}^{-1}$, $5 \times 10^{-9} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-9} seg^{-1} , $5 \times 10^{-8} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-8} seg^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-7} seg^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-6} seg^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-5} seg^{-1} , $5 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-4} seg^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-3} seg^{-1} , $5 \times 10^{-2} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-2} seg^{-1} , $5 \times 10^{-1} \text{ seg}^{-1}$ o 10^{-1} seg^{-1} .

Los experimentos de unión para determinar las KD y constantes de disgregación se pueden realizar en una variedad de condiciones que incluyen, pero no están limitadas a, [pH 6,0, 0,01% de Tween 20^{MR}], [pH 6,0, 0,1% de gelatina], [pH 5,0, 0,01% de Tween 20^{MR}], [pH 9,0, 0,1% de Tween 20^{MR}], [pH 6,0, 15% de etilenglicol, 0,01% de Tween 20^{MR}], [pH 5,0, 15% de etilenglicol, 0,01% de Tween 20^{MR}] y [pH 9,0, 15% de etilenglicol, 0,01% de Tween 20^{MR}], los amortiguadores en los cuales se hacen estas soluciones pueden ser determinados fácilmente por una persona de experiencia en el campo, y dependen en gran medida del pH deseado de la solución final. Las soluciones de pH bajo (<pH 5,5) se pueden hacer, por ejemplo, en amortiguador de citrato, amortiguador de glicina-HCl o en amortiguador de ácido succínico. Las soluciones de pH alto se pueden hacer, por ejemplo, en Tris-HCl, amortiguadores de fosfato o amortiguadores de bicarbonato de sodio. Se puede utilizar una variedad de condiciones para determinar la KD y las constantes de disgregación con el propósito de determinar, por ejemplo, el pH y/o las concentraciones de sales óptimas.

En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés con una $K_{\text{Disgregación}}$ que varía de $0,1$ a 10^{-7} seg^{-1} , de 10^{-2} a 10^{-7} seg^{-1} o de $0,5 \times 10^{-2}$ a 10^{-7} seg^{-1} . En una modalidad específica, un DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) se une a un objetivo de interés con una constante de disgregación ($K_{\text{Disgregación}}$) menor que $5 \times 10^{-2} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-2} seg^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ o 10^{-3} seg^{-1} . En una modalidad adicional, un DBDpp, se une a un objetivo de interés con una constante de disgregación ($K_{\text{Disgregación}}$) menor que $5 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-4} seg^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$ o 10^{-5} seg^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-6} seg^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ o 10^{-7} seg^{-1} .

En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés con una K_{Afinidad} que varía de 10^3 a $10^7 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$, de 10^3 a $10^6 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ o de 10^3 a $10^5 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$. En otras modalidades específicas, un DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) se une al objetivo de interés su objetivo de interés con una constante de afinidad (K_{Afinidad}) mayor que $10^3 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ o $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$. En una modalidad adicional, un DBDpp se une a un objetivo de interés con una K_{Afinidad} mayor que $10^5 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{seg}^{-1}$ o $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{seg}^{-1}$ o $10^7 \text{ M}^{-1} \text{seg}^{-1}$.

Objetivos de Interés del DBDpp

El objetivo de interés unido específicamente a un DBDpp puede ser cualquier molécula para la cual es deseable que un DBDpp se una. Por ejemplo, los objetivos unidos específicamente por un DBDpp pueden ser cualquier objetivo de relevancia o valor de purificación, manufactura, de formulación, terapéutico, de diagnóstico o pronóstico. A manera de ejemplo, en este documento se proporciona una variedad de objetivos ejemplares, y se pretende que sean ilustrativos y no limitantes. El objetivo de interés puede ser de origen natural o sintético. El objetivo de interés puede ser un componente extracelular o un componente intracelular, un factor soluble (por ejemplo, una enzima, hormona, citocina y factor de crecimiento, toxina, veneno, contaminante, etcétera) o una proteína transmembrana (por ejemplo, un receptor de la superficie celular). En una modalidad, el objetivo de interés unido específicamente por un DBDpp es en sí un DBDpp que tiene una secuencia diferente.

En una modalidad, una proteína de fusión de DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés sobre la superficie de una célula objetivo. En una modalidad adicional, la proteína de fusión de DBDpp se une específicamente a un receptor de la superficie celular. En una modalidad, una proteína de fusión de DBDpp se une específicamente a

un objetivo de interés que es un miembro de una familia seleccionada de: un receptor de factor de crecimiento, un receptor de tirosina cinasa, un receptor de la familia de TNF, un receptor acoplado a la proteína G, y un receptor de quimiocina. En algunas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp se une a múltiples miembros de la misma familia (por ejemplo, los receptores de TNF TRAILR1 y TRAILR2). En algunas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp se une a miembros de diferentes familias. De esta manera, por ejemplo, en algunas modalidades, una proteína de fusión de DBDpp se puede unir a un receptor de factor de crecimiento y un receptor de TNF o un receptor acoplado a la proteína G y un receptor de quimiocina.

En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a una proteína del suero o una proteína terapéutica, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En algunas modalidades, un objetivo de interés unido a un DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) es una proteína de humano. En una modalidad, un DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) se une a un objetivo de interés de proteína de humano y su ortólogo de mono (por ejemplo, mono cynomolgus), ratón, conejo, hámster y/o conejo.

En una modalidad un DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés que es una proteína del suero. En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a una proteína del suero seleccionada de: albúmina de suero (por ejemplo, albúmina de suero de humano (HSA)), proteína de unión a tiroxina, transferrina, fibrinógeno y una inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgE e IgM). Sin desear ser limitado por teoría alguna, se cree que la unión de un DBDpp a una proteína portadora confiere al DBDpp (o una fusión del mismo) un perfil farmacodinámico mejorado que incluye, pero no está limitado a, fijación como objetivo de tumores mejorada, penetración de tumores, difusión dentro del tumor y actividad terapéutica mejorada en comparación con la proteína de fusión de DBDpp en la cual falta la secuencia de unión de la proteína portadora (véase, por ejemplo, el documento WO 01/45746, los contenidos del cual se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad).

En una modalidad el objetivo de interés unido específicamente por un DBDpp es un antígeno relacionado con una enfermedad. El antígeno puede ser un antígeno característico de un cáncer y/o de un tipo particular de célula (por ejemplo, una célula hiperproliferativa) y/o de un patógeno (por ejemplo, una célula bacteriana (por ejemplo, tuberculosis, viruela y ántrax), un virus (por ejemplo, VIH), un parásito (por ejemplo, malaria y leishmaniosis), una infección fúngica, un moho, un micoplasma, un antígeno priónico, o un antígeno asociado con un trastorno del sistema inmune.

En una modalidad adicional, el objetivo de interés unido por un DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) es un antígeno bacteriano, un antígeno viral, un antígeno fúngico, un antígeno de micoplasma, un antígeno priónico o un antígeno de parásito (por ejemplo, uno que infecta a un mamífero). En una modalidad, el objetivo de un DBDpp es ántrax, hepatitis B, rabia, virus Nipah, Virus del Nilo Occidental, virus de meningitis o CMV. En una modalidad adicional, un DBDpp se une específicamente a un patógeno.

En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a un objetivo de cáncer. En otra modalidad, un DBDpp se une específicamente a un TSA o TAA. En algunas modalidades el DBDpp se une específicamente a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de PTGER4, ITGA4, CD37, CD52, CD62L (L-selectina), CXCR4, CD69, EVI2B (CD361), SLC39A8, MICB, LRRC70, CLELC2B, HMHA1, LST1 y CMTM6 (CKLFSF6).

En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a CD19 (B-CLL, B-ALL, leucemia, linfoma, BNHL/CLL, ALL pos-HCST, malignidades de linfoma B, malignidades de linaje B), CD20 (linfoma de células del manto/B-NHL indoloro), PMSA (cáncer de próstata), CEA (cáncer de mama, cáncer colorrectal), Her2/neu (cáncer pulmonar, osteosarcoma, glioblastoma), cadena ligera kappa (B-NHL y B-CLL).

En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a un objetivo seleccionado del grupo que consiste de CD47, CTLA4, DR5, KIR, LAG3, OX40, PD-L1 y TIM3.

En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés que se selecciona del grupo que consiste de: PDGFRA, PDGFRB, PDGFA, PDGFB, PDGFCC, PDGFC, PDGFD, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VEGFC, VEGF-D, neuropilina 2 (NRP2), betacelulina, PLGF, RET (reordenado durante la transfección), TIE1, TIE2(TEK), CA125, CD3, CD4, CD7, CD10, CD13, CD19, CD22, CD25, CD30, CD32, CD32b, CD33, CD38, FRSF5 (CD40), CD44 (por ejemplo, CD44v6), CD47, CD49e (integrina alfa 5), CD52, CD54 (ICAM), CD55, CD64, CD74, CD80, CD90, CD117 (cKit), CD133, CD200, (prominina 1), CD147, CD166, CD200, ESA, SHH, DHH, IHH, parchado 1 (PTCH1), alisado (SMO), WNT1, WNT2B, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT7B, WNT8A, WNT10A, WNT10B, WNT16B, LRP5, LRP6, FZD1, FZD2, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, Notch, Notch1, Notch3, Notch4, DLL4, Jagged, Jagged1, Jagged2, Jagged3, TNFSF1 (TNFb, LTa), TNFRSF1A (TNFR1, p55, p60), TNFRSF1B (TNFR2), TNFSF6 (Ligando Fas), TNFRSF6 (Fas, CD95), TNFRSF6B (DcR3), TNFSF4 (Ligando OX40), TNFSF5 (Ligando CD40), TNFSF7 (Ligando CD27, CD70), TNFRSF7 (CD27), TNFSF8 (Ligando CD30), TNFSF9 (Ligando 41BB), TNFRSF8 (CD30), TNFSF11 (RANKL), TNFRSF10A (TRAILR1, DR4), TNFRSF10B (TRAILR2, DR5), TNFRSF4 (OX40), TNFRSF11A (RANK), TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF12 (TWEAKR), TNFSF13 (APRIL), TNFSF13B (BLYS), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFFR), TNFSF15 (TL1A), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF19L (KELT), TNFRSF19 (TROY), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF25 (DR3), ANG1 (ANGPT1), ANG2 (ANGPT2), ANG3 (ANGPTL1), ANG4 (ANGPT4), TIE2, IL1 alfa, IL1 beta, IL1RI, IL1R2, IL2 IL2R, IL5, IL5R, IL6, IL6R, IL8, IL8R, IL10,

IL10R, IL12, IL12R, IL13, IL13R, IL15, IL15R, IL18, IL18R, IL19, IL19R, IL21, IL21R, IL23, IL23R, mif, XAG1, XAG3, REGIV, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, ALK, ALK1, ALK7, ALCAM, Artemin, Ax1, TGFb, TGFb2, TGFb3, TGFBR1, IGFIIR, BMP2, BMP5, BMP6, BMPR1, GDF3, GDF8, GDF9, N-caderina, E-caderina, VE-caderina, EPCAM (EGP2), NCAM, LI CAM (GDI 71), gangliosida GM2, gangliosida GD2, calcitonina, PSGR, DCC, CDCP1, CXCR2, CXCR7, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR10, CXCR4, CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, Claudin1, Claudin2, Claudin3, Claudin4, TMEFF2, neuregulina, MCSF, CSF, CSFR (fms), GCSF, GCSFR, BCAM, HPV, hCG, SR1F, PSA, FOLR2 (receptor beta de folato), BRCA1, BRCA2, HLA-DR, ABCC3, ABCB5, HM 1.24, LFA1, LYNX, S100A8, S100A9, SCF, factor Von Willebrand, receptor de Lewis Y6, Lewis Y, CA G250 (CA9), CRYPTO, VLA5, CTLA4, HLA-DR, MUCI, MUCI 8, mucin CanAg, gangliosida GD3, EGFL7, PDGFRa, IL21, IGF1, IGF2, HGF, PSMA, SLAMF7, antígeno carcinoembrionario (CEA), FAP, integrina avb3, integrina $\alpha 5\beta$ activina B1 alfa, receptor de leucotrieno B4 (LTB4R), receptor de neurotensina NT (NTR), antígeno 5T4 oncofetal, Tenascina C, MMP, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12, MMP14, MMP26, cathepsina G, cathepsina H, cathepsina L, SULF1, SULF2, MET, UP A, MHCL MN (CA9), TAG-72, TM4SF1, Heparanasa (HPSE), sindecano (SDC1), Efrina B2, Efrina B4, neuropilina T 1 (NRP1), TEM1, mesotelina, TGFbeta 1, TGFBR1, FcRn, fosfatidilserina, receptor alfa de folato (FOLR1) y relaxin2. Se pretende que los objetivos anteriores y aquellos descritos de otra manera en este documento sean ilustrativos y no limitantes.

En una modalidad, un DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado de: VEGF, VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, IGF1R, integrina, cMet, EGFR, ErbB2 (Her2), CD20, factor de crecimiento de nervios (NGR), receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, ErbB3 (Her3), ErbB4, antígeno de membrana específico de próstata.

En una modalidad, un objetivo de interés unido específicamente por un DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) es un antígeno asociado con un trastorno autoinmune, un trastorno inflamatorio u otro trastorno del sistema inmune o está asociado con la regulación de una respuesta inmune.

En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés que es un objetivo inmunoinhibidor. En otra modalidad, un DBDpp se une específicamente a un objetivo inmunoinhibidor seleccionado de: IL1, IL1b, IL1Ra, IL5, IL6, IL6R, CD26L, CD28, CD80, FcRn o FcGamma RIIB. En otra modalidad, un DBDpp se une específicamente a un objetivo inmunoestimulador seleccionado de: CD25, CD28, CTLA4, PD1, B7-H1 (PD-L1), B7-H4, IL10, TGFbeta, TNFSF4 (Ligando OX40), TNFRSF4 (OX40), TNFSF5 (Ligando CD40), TNFRSF5 (CD40), TNFSF9 (Ligando 41BB), TNFRSF9 (41BB, CD137), TNFSF14 (LIGHT, Ligando HVEM), TNFRSF14 (HVEM), TNFSF15 (TL1A), TNFRSF25 (DR3), TNFSF18 (Ligando G1TR) y TNFRSF18 (G1TR).

En una modalidad adicional, un DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado de: IL1Rb, IL2, IL3, IL4, IL7, IL11, IL15, IL16, IL17, IL17A, IL17F, IL18, IL19, IL25, IL-32, IL33, interferón beta, SCF, BCA1/CXCL13, CXCL1, CXCL2, CXCL6, CXCL13, CXCL16, C3AR, C5AR, CXCR1, CXCR2, CCR1, CCR3, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, ChemR23, CCL3, CCL5, CCL11, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, MPL, GP130, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9, TREM1, TREM2, oncostatina M, linfotoxina alfa (LTa), subunidad de integrina beta 7, CD49a (integrina alfa 1), integrina $\alpha 5\beta 3$, MIF, ESM1, WIF1, cathepsina B, cathepsina D, cathepsina K, cathepsina S, TNFSF2 (TNFa), TNFSF3 (LTB), TNFRSF3 (LTBR), TNFSF6 (Ligando Fas), TNFRSF6 (Fas, CD95), TNFRSF6B (DcR3), TNFSF8 (Ligando CD30), TNFRSF8 (CD30), TNFSF11 (RANKL), TNFRSF11A (RANK), TNFRSF16 (NGFR), TNFRSF19L (RELt), TNFRSF19 (TROY), TNFRSF21 (DR6), CD14, CD23 CD36, CD36L, CD39, CD52, CD91, CD137, CD153, CD164, CD200, CD200R, BTLA, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7h, B7-DC (PDL2), ICOS, ICOSL, MHC, CD, B7-H2, B7-H3, B7x, SLAM, KIM-1, SLAMF2, SLAMF3, SLAMF4, SLAMF5, SLAMF6 y SLAMF7, TNFSF1A (TNF-alfa), TNFRSF1A (TNFR1, p55, p60), TNFRSF1B (TNFR2), TNFSF7 (Ligando CD27, CD70), TNFRSF7 (CD27), TNFSF13B (BLYS), TNFSF13 (APRIL), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFFR), TNFRSF17 (BCMA), TNFSF12 (TWEAK), TNFRSF12 (TWEAKR), TNFRSF5 (CD40), IL1, IL1b, IL1R, IL2R, IL4-Ra, IL5, IL5R, IL6, IL6R, IL9, IL12, IL13, IL14, IL15, IL15R, IL17f, IL17R, IL17Rb, IL17RC, IL20, IL21, IL22RA, IL23, IL23R, IL31, TSLP, TSLPR, interferón alfa, interferón gamma, B7RP1, cKit, GMCSF, GMCSFR, CTLA4, CD2, CD3, CD4, CD11a, CD18, CD20, CD22, CD30, CD40, CD86, CXCR3, CXCR4, CCR2, CCR4, CCR5, CCR8, CCL2, CXCL10, P1GF, subunidad de integrina alfa4, integrina A4B7, C5, RhD, IgE y Rh.

En otra modalidad, un DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado de: amiloide beta (Abeta), beta amiloide, factor de complemento D, PLP, ROBO4, ROBO, GDNF, NGF, LINGO, miostatina, LDL oxidado, gp11b, gp111a, PCSK9, Factor VIII, integrina $\alpha 2\beta 3$, AOC3, mesotelina, DKK1, osteopontina, cathepsina K, TNFRSF19L (RELt), TNFRSF19 (TROY) y esclerostina.

En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: CD137, CD47, CTLA4, DR5, KIR, PD-L1, PD1 y TIM3.

En una modalidad, un DBDpp se une específicamente al CD137. En una modalidad adicional, un DBDpp se une específicamente al CD137 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: (a) MGSWVEFGHRLWAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESEQLQAYKGKGNPEVEK LRQRAAFIRFRLQAYRHN (SEQ ID NO:12), (b) MGSWVEFANRLWAIDQRLFALGGS EAELAAFEKEIAAFESEQLQAYKGKGNPEVEHLRDQAAFIRHKLQAYRHN (SEQ ID NO:13), (c)

- MGSWYEFRLHRLWIDQRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGK GNPEVEGLREAAAFIRAKLQAYRHN (SEQ ID NO:14), (d) MGSWYEFMSRLWIDQRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEALRAKAAAYIRWKLQAYRHN (SEQ ID NO:15), (e) MGSWFEFNHRLWAINERLYALGGSEAELAAFEKEIAA FESELQAYKGKGNPEVERLRSMAAFIRYKLQAYRHN (SEQ ID NO:16), (f) MGSWY EFGHRLWIDQRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEYLRETA HIRTRLQAYRHN (SEQ ID NO:17), (g) MGSWYEFHYRLHAIDQRLYALGGSEAELAA FEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEELRIKAAFIKRLQAYRHN (SEQ ID NO:18) y (h) MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFLGEIWAFAFEMELAAAYKGKGNPEV
- 10 EALGREAAAIRMELQAYRHN (SEQ ID NO:19). Se proporciona otro DBDpp y polipéptidos que se unen completa o parcialmente (por ejemplo, se traslapan con un epítipo) al mismo epítipo de CD137 como un DBDpp anterior. Adicionalmente, también se proporciona un DBDpp y polipéptidos que compiten completa o parcialmente con un DBDpp anterior por la unión al CD137. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp, ya que son vectores que contienen los ácidos nucleicos y células hospedantes que contienen los ácidos nucleicos y vectores.
- 15 En una modalidad un DBDpp se une específicamente al CD47. En una modalidad adicional, un DBDpp se une específicamente al CD47 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) MGSWYEFDLRLHAIYDRLVALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEIL RDNAAYIRQMLQAYRHN (SEQ ID NO:20), (b) MGSWVEFANRLWIDQRLFALGGS
- 20 EAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEHLRDQAAFIRHKLQAYRHN (SEQ ID NO:21), (c) MGSWTEFTYRLSAIEWRLWALGGSEAELAWFEQKIAFFEDFLQYYKGK GNPEVEALKHEAGAILNELMAYRHN (SEQ ID NO:22), (d) MGSWAEFDHRLHAIRE RLHALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEILRGNAAYIRALLQAYRHN (SEQ ID NO:23) y (e) MGSWTEFVGRLLAEFRLWALGGSEAELAWFEAHIAFFE DYQLQWYKGKGNPEVEALREEAGAIMELKAYRHN
- 25 (SEQ ID NO:24). Se proporciona otro DBDpp y polipéptidos que unen completa o parcialmente al mismo epítipo del CD47 como un DBDpp anterior. Adicionalmente, también se proporciona un DBDpp y polipéptidos que compiten completa o parcialmente con un DBDpp anterior por la unión al CD47. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp, ya que son vectores que contienen los ácidos nucleicos y células hospedantes que contienen los ácidos nucleicos y vectores.
- 30 En una modalidad un DBDpp se une específicamente a CTLA4. En una modalidad adicional, un DBDpp se une específicamente a CTLA4 y comprende una secuencia de aminoácidos de MGSWHEFHDLRLQAIHERLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQ AYKGKGNPEVESLRIAAAHIRQVLQAYRHN (SEQ ID NO:25). Se proporciona otro DBDpp y polipéptidos que se unen completa o parcialmente al mismo epítipo de CTLA4 como el DBDpp anterior. Adicionalmente, también se proporciona un DBDpp y polipéptidos que compiten completa o parcialmente con el DBDpp anterior por la unión a CTLA4. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp, ya que son vectores que contienen los ácidos nucleicos y células hospedantes que contienen los ácidos nucleicos y vectores.
- 35 En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a DR5. En una modalidad adicional, un DBDpp se une específicamente a DR5 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) MG SWNYFKDHLAWIKNSLEALGGSEAELAHFETAIAFSERQLQEYKGKGNPEVEALRK EAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:26), (b) MGSWLYFKEHLAHLKAWLEALGGS
- 40 EAELAHFELAIADFEYHLQEYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:27), (c) MGSWTEFTYRLSAIEWRLWALGGSEAELAWFEQKIAFFEDFLQYYKGK GNPEVEALKHEAGAILNELMAYRHN (SEQ ID NO:28), (d) MGSWYFQKHLAWIKS
- 45 YLEALGGSEAELAHFERAIAAFEQHLQMYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYR HN (SEQ ID NO:29), (e) MGSWYFQKDLAEIKLLEALGGSEAELAHFEMAIAID FEHNLQYYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:30), (f) MGSWH YFKGHLAEIKNHLEALGGSEAELAHFERAIAAFERSLQWYKGKGNPEVEALRKEAA
- 50 AIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:31), (g) MGSWIYFKEHLAYIKKEALGGSEAE LAHFESAIAVFESTLQYYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:32), (h) MGSWYFKEHLAEIKYMLEALGGSEAELAHFEVAIADFEKMLQYYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:33) y (i) MGSWWLFKDL AEIKTALEALGGSEAELAHFEMAIAAFQKQLQYYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDEL
- 55 QAYRHN (SEQ ID NO:34). Se proporciona otro DBDpp y polipéptidos que se unen completa o parcialmente al mismo epítipo de DR5 como un DBDpp anterior. Adicionalmente, también se proporciona un DBDpp y polipéptidos que compiten completa o parcialmente con un DBDpp anterior por la unión a DR5. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp, como son vectores que contienen los ácidos nucleicos y células hospedantes que contienen los ácidos nucleicos y vectores.
- 60 En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a KIR. En una modalidad adicional, un DBDpp se une específicamente a KIR y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) MG SWSEFYNRLDAIESRLALGGSEAELALFEIQARFEKVLQAYKGKGNPEVEALR GEARAIFAELYAYRHN (SEQ ID NO:35), (b) MGSWYEFYNRLYAIERLYALGGSEA
- 65 ELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVERLRVRAAKIRVILQAYRHN (SEQ ID NO:36) y (c) MGSWLWFKFLAEIKYFLEALGGSEAELAAFDIEIHAFHVELFAYKG KGNPEVEVLREVAEIRWDLQAYRHN (SEQ ID NO:37). Se proporciona otro DBDpp y polipéptidos que se unen completa o parcialmente al mismo epítipo de KIR

como un DBDpp anterior. Adicionalmente, también se proporciona un DBDpp y polipéptidos que compiten completa o parcialmente con un DBDpp anterior por la unión a KIR. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp, ya que son vectores que contienen los ácidos nucleicos y células hospedantes que contienen los ácidos nucleicos y vectores.

En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a PD-L1. En una modalidad adicional, un DBDpp se une específicamente a PD-L1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) MGSWTEFQSRLDAIHSRLRALGGSEAEAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVELLR DDAAFIRHFLQAYRHN (SEQ ID NO:38), (b) MGSWQEFDDRLNAIKARLQALGGSEA ELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEDLRDDAAFIRFLQAYRHN (SEQ ID NO:39), (c) MGSWYEFQNRHLAIHERLNLALGGSEAEAAFEKEIAAFESSELQAYKGK GNPEVELLRDDAAFIRHFLQAYRHN (SEQ ID NO:40), (d) MGSWFEFQDRLTAINER LSALGGSEAEAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVETLRSDAAFIRFLQAYRHN (SEQ ID NO:41), (e) MGSWYEFESRLDAIHERLHALGGSEAEAAFEKEIAAFESE LQAYKGKGNPEVENLRGDAAFIRHFLQAYRHN (SEQ ID NO:42), (f) MGSWYEFNHR LDAISKRLNALGGSEAEAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEELRGDAAFIRHFL QAYRHN (SEQ ID NO:43) y (g) MGSWFEFENRLHAIVHRLGALGGSEAEAAFE KEIAAFESSELQAYKGKGNPEVETLRDAAFIRHYLQAYRHN (SEQ ID NO:44). Se proporciona otro DBDpp y polipéptidos que se unen completa o parcialmente al mismo epítipo de PD-L1 como un DBDpp anterior. Adicionalmente, también se proporciona un DBDpp y polipéptidos que compiten completa o parcialmente con un DBDpp por la unión a PD-L1. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp, ya que son vectores que contienen los ácidos nucleicos y células hospedantes que contienen los ácidos nucleicos y vectores.

En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a PD1. En una modalidad adicional, un DBDpp se une específicamente a PD1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de (a) MGSWTIFKEWLAFIKTDLEALGGSEAEALFFEGWIASFEMELQKYKGKGNPEVEAL RKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:46), (b) MGSWVMFKWLLADIKSHLEALGG SEAEALFFEGFIAAFETHLQVYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:47), y (c) MGSWYAFKDYLDADIKGWLEALGGSEAEALFFEIFIARFELELQAY KGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:48). Se proporciona otro DBDpp y polipéptidos que se unen completa o parcialmente al mismo epítipo de PD1 como un DBDpp anterior. Adicionalmente, también se proporciona un DBDpp y polipéptidos que compiten completa o parcialmente con un DBDpp anterior por la unión a PD1. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp, ya que son vectores que contienen los ácidos nucleicos y células hospedantes que contienen los ácidos nucleicos y vectores.

En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a TIM3. En una modalidad adicional, un DBDpp se une específicamente a TIM3 y comprende una secuencia de aminoácidos de MGSWHEFHDLRLQAIHERLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESSEL QAYKGKGNPEVESLRIAAAHIRQVLQAYRHN (SEQ ID NO:45). Se proporciona otro DBDpp y polipéptidos que se unen completa o parcialmente al mismo epítipo de TIM3 como el DBDpp anterior. Adicionalmente, también se proporciona un DBDpp y polipéptidos que compiten completa o parcialmente con el DBDpp por la unión a TIM3. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el DBDpp, ya que son vectores que contienen los ácidos nucleicos y células hospedantes que contienen los ácidos nucleicos y vectores.

En otra modalidad, el DBDpp se une a una marca de péptido presente en un objetivo de interés. Estas marcas de péptidos proporcionan un medio útil por medio del cual se purifican, se detectan y/o se adhieren objetivos de interés que contienen las marcas de péptidos. En una modalidad, un DBDpp se une específicamente a una marca de péptido seleccionada del grupo de: una marca de hexahistidilo (His6), una marca de myc o una marca FLAG. Otras marcas de péptidos se describen en este documento o son conocidas de otra manera en el campo.

En otra modalidad, el objetivo al cual se une el DBDpp es la materia de purificación de una mezcla de contaminantes. En una modalidad el objetivo puede ser una proteína natural o expresada de manera recombinante que requiere el aislamiento selectivo de un lisado de células o el sobrenadante del cultivo de células.

Proteínas de Fusión de DBDpp

Un "polipéptido de fusión", una "proteína de fusión", un "polipéptido quimérico", una "proteína quimérica", un "antígeno quimérico" es un polipéptido comprendido de por lo menos dos polipéptidos y opcionalmente un conector para vincular de manera operativa los dos polipéptidos en un polipéptido continuo producido, por ejemplo, por medio de procesos recombinantes. Los dos polipéptidos pueden adherirse de manera operable directa o indirectamente.

Una "proteína de fusión de DBDpp" comprende por lo menos un DBDpp que se une específicamente a un objetivo de interés. En una modalidad, las proteínas de fusión de DBDpp comprenden más de un DBDpp, en donde dos o más DBDpp tienen las mismas o diferentes especificidades. En modalidades adicionales, la proteína de fusión de DBDpp está comprendida de una repetición en tándem del mismo o diferente DBDpp que permite que una proteína de fusión de DBDpp se una a múltiples objetivos y/o epítopos de repetición o diferentes epítopos en el objetivo. En modalidades adicionales, una proteína de fusión de DBDpp comprende un DBDpp y una secuencia de polipéptidos que contiene

un dominio adicional. En algunas modalidades, una proteína de fusión de DBDpp comprende un DBDpp y un miembro seleccionado de: un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un dominio de unión a antígenos o una porción del mismo (por ejemplo, un scFv), un dominio efector o una porción del mismo, un dominio de unión a FcRn o una porción del mismo y un Fc o una porción del mismo), una proteína del suero (por ejemplo, albúmina o una porción de la misma), una citocina, un factor de crecimiento, una hormona, un agente de imagenología, un agente de etiquetado y una marca de péptido. En algunas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio Fc de humano) o una porción de la misma. En modalidades adicionales, el dominio Fc es un dominio Fc de humano variante.

El DBDpp proporcionado en este documento incluye proteínas de fusión de DBDpp. Un DBDpp y cualquier polipéptido de interés se pueden vincular de manera operable para formar una proteína de fusión de DBDpp. De esta manera, en algunas modalidades, el DBDpp se incorpora en un complejo molecular de múltiples dominio, más grande (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp monomérica o multimérica) y al hacerlo, confiere los atributos funcionales del DBDpp incorporado a la proteína de fusión resultante. En algunas modalidades, las proteínas de fusión de DBDpp comprenden un DBDpp y una secuencia de polipéptidos de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una proteína del suero (por ejemplo, albúmina de suero de humano) o un fragmento de proteína del suero o un receptor de la superficie celular, una cadena alfa de un receptor de células T (TCR), una cadena beta de un receptor de células T, citocina, factor de crecimiento, hormona, o enzima, o un fragmento de la misma. La incorporación del DBD en complejos multidominio y/o multifuncionales se puede lograr de manera rutinaria por medio de la fusión recombinante a otro polipéptido, la unión a otra porción química y la vinculación química covalente a otro polipéptido (u otro compuesto químico deseable) utilizando técnicas conocidas en el campo. Las proteínas de fusión de DBDpp pueden contener adicionalmente otros componentes opcionales tales como conectores y otros componentes descritos en este documento.

Múltiples de DBDpp

En algunas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp contiene un DBDpp. En algunas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp comprende por lo menos 2, 3, 4, o 5, o más de 5 DBDpp. En algunas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp contiene 1-3, 1-4, 1-5 o más de 5 diferentes DBDpp. En algunas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp contiene por lo menos 2, 3, 4 o 5, o más de 5 DBDpp diferentes. De esta manera, una proteína de fusión de DBDpp puede ser un DBDpp monomérico (es decir, que contiene un DBDpp) o DBDpp multimérico (es decir, que contiene más de un DBDpp en tándem conectados opcionalmente de manera operable por un conector). Las modalidades no limitantes de estos DBDpp multiméricos se muestran en la FIGURA 5A. En varias modalidades, el uso de DBDpp multiméricos proporciona una unión mejorada a objetivos (por ejemplo, sinérgica). En modalidades adicionales, un DBDpp multimérico permite la fijación como objetivo de más de un objetivo utilizando una construcción de DBDpp individual (por ejemplo, bi-, tri-específica, etcétera).

La proteína de fusión de DBDpp multimérica puede ser un DBDpp homo-multimérico (es decir, que contiene más de uno del mismo DBDpp en tándem conectado opcionalmente por conector(es) (por ejemplo, homodímeros, homotrímeros, homotetrámeros, etcétera) o DBDpp hetero-multimérico (es decir, que contiene dos o más DBDpp en los cuales hay por lo menos dos proteínas de DBDpp diferentes. El número de DBDpp monoméricos incluidos dentro de una composición multimérica puede variar, dependiendo de la modalidad, y puede ser definido, por lo menos en parte, por el sistema de expresión en el cual se produce el DBDpp. En varias modalidades, sin embargo, las proteínas de fusión pueden comprender múltiplos de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 subunidades de DBDpp, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 subunidades, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 subunidades, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 subunidades, o de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 subunidades (incluyendo números entre aquellos listados así como también puntos finales). Por otra parte, múltiples componentes en tándem de una proteína de fusión de DBDpp pueden contener los mismos o diferentes DBDpp. En algunas fusiones de DBDpp, los DBDpp están presentes como un monómero, o en homomúltiplos o heterómicos tales como homodímeros o heterodímeros, homotrímeros o heterotrímeros, homotetrámeros o heterotetrámeros.

En una modalidad, dos o más DBDpp se fusionan de manera operable para formar una proteína de fusión de DBDpp. En una modalidad, el asociado de fusión de un DBDpp es un DBDpp idéntico. La vinculación de dos o más DBDpp idénticos da por resultado una molécula multivalente que proporciona distintas ventajas (por ejemplo, avidez de unión incrementada, agrupación de objetivos y activación de receptores) sobre las composiciones monoméricas. En otra modalidad el asociado de fusión de un DBDpp es un DBDpp no idéntico. La vinculación de dos o más DBDpp no idénticos da por resultado una molécula multivalente y multispecífica que tiene el potencial de unirse a más de un antígeno objetivo, ya sea independiente o simultáneamente.

Una proteína de fusión de DBDpp puede ser "mono-específica" o "multiespecífica". Una proteína de fusión de DBDpp que es "multiespecífica" (por ejemplo, biespecífica, triespecífica o de multi-especificidad mayor) reconoce y se une a dos o más epítopos diferentes que están presentes en una o más moléculas diferentes (por ejemplo, proteínas, estructuras de soporte sólido, etcétera).

En una modalidad, una proteína de fusión de DBDpp multiespecífica contiene por lo menos dos DBDpp que se unen

a por lo menos dos epítomos diferentes en un objetivo de interés individual. En modalidades adicionales, una proteína de fusión de DBDpp multiespecífica comprende por lo menos un DBDpp que se une específicamente a un epítomo en un objetivo de interés y por lo menos otro dominio o secuencia que confiere una función (por ejemplo, un fragmento o dominio de anticuerpo tal como un scFv) que se une específicamente a un epítomo diferente en el mismo objetivo de interés. En una modalidad, una proteína de fusión de DBDpp multi-específica comprende por lo menos un DBDpp que se une específicamente a un epítomo en un objetivo de interés y por lo menos un dominio o secuencia que confiere una función por ejemplo, un fragmento o dominio de anticuerpo (por ejemplo, scFv), que se une específicamente a un epítomo en un objetivo de interés diferente. En otras modalidades, una proteína de fusión de DBDpp comprende por lo menos un DBDpp y por lo menos otro DBDpp o secuencia de dominio que confiere una función, por ejemplo, un fragmento o dominio de anticuerpo, que se une específicamente a un soporte sólido.

En una modalidad adicional, las proteínas de fusión de DBDpp multiméricas que comprenden 2 o más DBDpp se fusionan a su vez con otras proteínas heterólogas (o sus subdominios) y al hacerlo, confieren las propiedades multivalentes y multiespecíficas al asociado de fusión. Los ejemplos de asociados de fusión de un DBDpp incluyen pero no están limitados a, anticuerpos, subdominios de anticuerpos (por ejemplo, dominios scFv o Fc), albúmina de suero, subdominios de albúmina de suero, receptores de la superficie celular, una cadena alfa de un receptor de células T (TCR), una cadena beta de un receptor de células T, subdominios de receptores de la superficie celular, péptidos, marcas de péptidos (por ejemplo, FLAG o myc), repeticiones de fibronectina tipo III, dominios z, polipéptidos de tipo elastina. El número y la ubicación de DBDpp y sus posiciones respectivas dentro de la proteína de fusión pueden variar. Por ejemplo, el(los) DBDpp(s) puede(n) estar localizado(s) en una o todas las terminales de un asociado de fusión y/o intercalado(s) dentro de subunidades heterólogas dentro del asociado de fusión de DBDpp.

En una modalidad, la fusión de DBDpp es biespecífica y se une específicamente a dos diferentes objetivos expresados sobre la superficie de dos tipos de células diferentes. En una modalidad la proteína de fusión de DBDpp biespecífica se une específicamente a un objetivo de célula cancerosa y un objetivo de célula efectora inmune. En una modalidad la proteína de fusión de DBDpp biespecífica se une específicamente a un objetivo expresado en una célula cancerosa (por ejemplo CD19) y un objetivo expresado sobre la superficie de un linfocito T (por ejemplo, CD3).

DBDpp como Fusiones a Anticuerpos y Fragmentos de Anticuerpos

En una modalidad, una proteína de fusión de DBDpp comprende un anticuerpo completo o un fragmento o dominio de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de IgG1, anticuerpo de IgG3, región variable de anticuerpo, CDR3, ScFv, Fc, dominio de unión de FcRn, y otros dominios de anticuerpos). Los DBDpp y las proteínas de fusión de DBDpp se pueden vincular de manera operable entre sí y/o con una o más terminales de un anticuerpo, cadena de anticuerpo, fragmento de anticuerpo o dominio de anticuerpo.

El componente de anticuerpo de una proteína de fusión de DBDpp puede ser cualquier inmunoglobulina completa o fragmento de anticuerpo adecuado (por ejemplo, un dominio de unión a antígenos y/o un dominio efector) o un fragmento de los mismos. En una modalidad, la proteína de fusión de DBDpp-anticuerpo retiene las propiedades estructurales y funcionales de un anticuerpo monoclonal tradicional. De esta manera, en algunas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp-anticuerpo retiene las propiedades de unión a epítomos, pero ventajosamente también incorpora, a través de la fusión de DBDpp, una o más especificidades de unión a objetivos adicionales. Los anticuerpos que se pueden utilizar en las fusiones de DBDpp incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos monoclonales, multiespecíficos, de humano, humanizados, primatizados y quiméricos. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo proporcionadas en este documento pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. En modalidades específicas, los anticuerpos son anticuerpos optimizados con Fc. Los anticuerpos pueden ser de o pueden derivarse de cualquier origen animal que incluye aves y mamíferos o se pueden generar sintéticamente. El componente de anticuerpo de la proteína de fusión de DBDpp-anticuerpo se puede derivar naturalmente o puede ser el resultado de diseño recombinante (por ejemplo, exhibición de fagos, xenotratón y sintético). En ciertas modalidades, el componente de anticuerpo de la fusión de anticuerpo-DBDpp mejora la vida media e incrementa o disminuye la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En algunas modalidades, los anticuerpos son anticuerpos de humano, murino, burro, conejo, cabra, cobayo, camello, llama, caballo o pollo. En modalidades específicas, los anticuerpos son de humano.

En una modalidad, un DBDpp se vincula de manera operable a un fragmento o subdominio de anticuerpo (por ejemplo, scFv, diacuerpo, documentos EP 404,097; WO 93/111161; WO 2014/028776; y Holliger y colaboradores, PNAS 90:6444-6448 (1993), cada uno de los cuales se incorpora en este documento a manera de referencia en su totalidad). El fragmento o subdominio de anticuerpo puede ser cualquier fragmento o dominio de un anticuerpo. Véase por ejemplo, los documentos WO 04/058820, WO 99/42077 y WO 05/017148, cada uno de los cuales se incorpora en este documento a manera de referencia en su totalidad. Por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp puede contener un dominio efector de anticuerpo o un derivado de un dominio efector de anticuerpo que confiere una o más funciones efectoras al DBDpp y/o confiere a la proteína de fusión de DBDpp la capacidad para unirse a uno o más receptores de Fc. En algunas modalidades, una proteína de fusión de DBDpp-anticuerpo contiene un fragmento de unión a antígenos de un anticuerpo o un fragmento del mismo. En modalidades adicionales, una proteína de fusión de DBDpp-anticuerpo contiene un dominio efector de inmunoglobulina que comprende uno o más dominios CH2 y/o CH3 de un

anticuerpo que tiene función efectora proporcionada por los dominios CH2 y CH3. Otras secuencias en la fusión de DBDpp que proporcionan una función efectora y que están comprendidas por la invención serán claras para aquellas personas expertas en el campo y se pueden seleccionar y diseñar de manera rutinaria en una proteína de fusión de DBDpp comprendida en este documento con base en la(s) función(es) efectora(s) deseada(s).

En una modalidad, el componente de anticuerpo de una fusión de anticuerpo-DBDpp proporcionado en este documento ha sido modificado para incrementar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (véase, por ejemplo, Bruhns y colaboradores, *Blood* 113:3716-3725 (2009); Shields y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001); Lazar y colaboradores, *PNAS* 103:4005-4010 (2006); Stavenhagen y colaboradores, *Cancer Res.*, 67:8882-8890 (2007); Horton y colaboradores, *Cancer Res.* 68:8049-8057 (2008); Zalevsky y colaboradores, *Blood* 113:3735-3743 (2009); Bruckheimer, *Neoplasia* 11:509-517 (2009); WO2006/0201 14; Strohl, *Curr. Op. Biotechnol* 20:685-691 (2009); y el documento WO2004/074455, cada uno de los cuales se incorpora en este documento a manera de referencia en su totalidad). Los ejemplos de modificaciones de diseño de secuencias de Fc contenidas en el componente de anticuerpo de las proteínas de fusión de DBDpp-anticuerpo que incrementa la ADCC incluyen una o más modificaciones que corresponden a: IgG1-S298A, E333A, K334A; IgG1-S239D, I332E; IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG1-P247I, A339D o Q; IgG1-D280H, K290S con o sin S298D o V; IgG1-F243L, R292P, Y300L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, P396L; e IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L; en donde la numeración de los residuos en la región Fc es aquella del índice EU de Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Quinta edición).

En una modalidad, la fusión de DBDpp contiene un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo que es un fragmento de unión a antígenos. En una modalidad adicional, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un antígeno relacionado con una enfermedad. En una modalidad la proteína de fusión de DBDpp comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de cáncer. En otra modalidad, la proteína de fusión de DBDpp comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un patógeno particular (por ejemplo, una célula bacteriana (por ejemplo, tuberculosis, viruela, ántrax)), un virus (por ejemplo, VIH), un parásito (por ejemplo, malaria, leishmaniosis), una infección fúngica, un moho, un micoplasma, un antígeno priónico. En otra modalidad, la proteína de fusión de DBDpp comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un patógeno particular (por ejemplo, una célula bacteriana (por ejemplo, tuberculosis, viruela, ántrax)), un virus (por ejemplo, VIH), un parásito (por ejemplo, malaria, leishmaniosis), una infección fúngica, un moho, un micoplasma o un antígeno priónico. En otra modalidad, la proteína de fusión de DBDpp comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado con una enfermedad o trastorno del sistema inmune.

En modalidades preferidas, la proteína de fusión de DBDpp que contiene un fragmento o dominio de anticuerpo retiene actividades del anticuerpo precursor. De esta manera, en ciertas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp que contiene un fragmento o dominio de anticuerpo tiene la capacidad de inducir la citotoxicidad dependiente del complemento. En ciertas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp que contiene un fragmento o dominio de anticuerpo tiene la capacidad de inducir la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

Por consiguiente, en algunas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp comprende un fragmento de anticuerpo que confiere a la proteína de fusión de DBDpp una característica biológica o bioquímica de una inmunoglobulina. En algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo confiere una característica seleccionada de: la capacidad para dimerizar de manera no covalente, la capacidad para localizarse en el sitio de un tumor y una vida media en suero incrementada en comparación con la proteína de fusión de DBDpp en la cual se han suprimido uno o más DBDpp. En ciertas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp es por lo menos tan estable como el anticuerpo correspondiente sin el DBDpp adherido. En ciertas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp es más estable que el anticuerpo correspondiente sin el DBDpp adherido. La estabilidad de la proteína de fusión de DBDpp se puede medir utilizando métodos establecidos que incluyen, por ejemplo, técnicas de ELISA. En algunas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp es estable en sangre entera (in vivo o ex vivo) a 37°C durante por lo menos aproximadamente 10 horas, por lo menos aproximadamente 15 horas, por lo menos aproximadamente 20 horas, por lo menos aproximadamente 24 horas, por lo menos aproximadamente 25 horas, por lo menos aproximadamente 30 horas, por lo menos aproximadamente 35 horas, por lo menos aproximadamente 40 horas, por lo menos aproximadamente 45 horas, por lo menos aproximadamente 48 horas, por lo menos aproximadamente 50 horas, por lo menos aproximadamente 55 horas, por lo menos aproximadamente 60 horas, por lo menos aproximadamente 65 horas, por lo menos aproximadamente 70 horas, por lo menos aproximadamente 72 horas, por lo menos aproximadamente 75 horas, por lo menos aproximadamente 80 horas, por lo menos aproximadamente 85 horas, por lo menos aproximadamente 90 horas, por lo menos aproximadamente 95 horas o por lo menos aproximadamente 100 horas (incluyendo cualquier tiempo entre aquellos listados). En una modalidad, una fusión de DBDpp contiene un dominio efector de inmunoglobulina o un dominio inductor de vida media que corresponde a un dominio o fragmento de inmunoglobulina en el cual por lo menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante han sido alterados con el propósito de proporcionar características bioquímicas deseadas tales como funciones efectoras reducidas o incrementadas, la capacidad para dimerizar de manera no covalente, capacidad incrementada para localizarse en el sitio de un tumor, vida media en suero reducida, o vida media en suero incrementada en comparación con un fragmento de inmunoglobulina que tiene la secuencia de inmunoglobulina no alterada correspondiente. Estas alteraciones de los dominios de región constante pueden ser sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos.

En una modalidad, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio efector de inmunoglobulina o un derivado de un dominio efector de inmunoglobulina que confiere citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) a la proteína de fusión de DBDpp. En modalidades adicionales, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un dominio efector de inmunoglobulina que ha sido modificada para incrementar la ADCC (véase, por ejemplo, Bruhns, *Blood* 113:3716-3725 (2009); Shields, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001); Lazar, *PNAS* 103:4005-4010 (2006); Stavenhagen, *Cancer Res.* 67:8882-8890 (2007); Horton, *Cancer Res.* 68:8049-8057 (2008); Zalevsky, *Blood* 113:3735-3743 (2009); Bruckheimer, *Neoplasia* 11:509-517 (2009); documento WO 06/020114; Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20:685-691 (2009); y documento WO 04/074455, los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad). Los ejemplos de modificaciones de diseño de fragmentos de inmunoglobulina contenidas en una secuencia de aminoácidos en una proteína de fusión de DBDpp que incrementa la ADCC incluyen secuencias de dominios efectores de inmunoglobulina que tienen una o más modificaciones que corresponden a: IgG1-S298A, E333A, K334A; IgG1-S239D, I332E; IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG1-P247I, A339D o Q; IgG1-D280H, K290S con o sin S298D o V; IgG1-F243L, R292P, Y300L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, P396L; e IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L; en donde la numeración de los residuos en la región Fc es aquella del índice EU de Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Quinta edición, incorporado en este documento a manera de referencia).

En otras modalidades, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un dominio efector de inmunoglobulina que ha sido modificada para disminuir la ADCC (véase, por ejemplo, Idusogie y colaboradores, *J. Immunol.* 166:2571-2575 (2001); Sazinsky y colaboradores, *PNAS* 105:20167-20172 (2008); Davis y colaboradores, *J. Rheumatol.* 34:2204-2210 (2007); Bolt y colaboradores, *Eur. J. Immunol.* 23:403-411 (1993); Alegre y colaboradores, *Transplantation* 57:1537-1543 (1994); Xu y colaboradores, *Cell Immunol.* 200:16-26 (2000); Cole y colaboradores, *Transplantation* 68:563-571 (1999); Hutchins y colaboradores, *PNAS* 92:11980-11984 (1995); Reddy y colaboradores, *J. Immunol.* 164:1925-1933 (2000); documentos WO 97/11971; WO 07/106585; US 2007/0148167A1; McEarchern y colaboradores, *Blood* 109:1185-1192 (2007); Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20:685-691 (2009); y Kumagai y colaboradores, *J. Clin. Pharmacol.* 47:1489-1497 (2007), los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad). Los ejemplos de modificaciones de diseño de secuencias de fragmentos de inmunoglobulina contenidas en una secuencia de aminoácidos en una proteína de fusión de DBDpp que disminuyen la ADCC incluyen secuencias de dominios efectores de inmunoglobulina que tienen una o más modificaciones que corresponden a: IgG1-K326W, E333S; IgG2-E333S; IgG1-N297A; IgG1-L234A, L235A; IgG2-V234A, G237A; IgG4-L235A, G237A, E318A; IgG4-S228P, L236E; IgG2-118-260; IgG4-261-447; IgG2-H268Q, V309L, A330S, A331S; IgG1-C220S, C226S, C229S, P238S; IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A; o IgG1-L234F, L235E, P331S; en donde la numeración de los residuos es aquella del índice UE de Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1991 Quinta edición, incorporado en este documento a manera de referencia).

En modalidades adicionales, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio efector de inmunoglobulina, o un derivado de un dominio efector de inmunoglobulina, que confiere la fagocitosis de células dependiente de anticuerpos (ADCP) a la proteína de fusión de DBDpp. En modalidades adicionales, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un dominio efector de inmunoglobulina que ha sido modificada para incrementar la fagocitosis de células dependiente de anticuerpos (ADCP); (véase, por ejemplo, Shields y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001); Lazar y colaboradores, *PNAS* 103:4005-4010 (2006); Stavenhagen y colaboradores, *Cancer Res.*, 67:8882-8890 (2007); Richards y colaboradores, *Mol. Cancer Ther.* 7:2517-2527 (2008); Horton y colaboradores, *Cancer Res.* 68:8049-8057 (2008), Zalevsky y colaboradores, *Blood* 113:3735-3743 (2009); Bruckheimer y colaboradores, *Neoplasia* 11:509-517 (2009); documento WO 06/020114; Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20:685-691 (2009); y documento WO 04/074455, los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad). Los ejemplos de modificaciones de diseño de fragmentos de inmunoglobulina contenidas en una secuencia de aminoácidos en una proteína de fusión de DBDpp que incrementan la ADCP incluyen secuencias de dominios efectores de inmunoglobulina que tienen una o más modificaciones que corresponden a: IgG1-S298A, E333A, K334A; IgG1-S239D, I332E; IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG1-P247I, A339D o Q; IgG1-D280H, K290S con o sin S298D o V; IgG1-F243L, R292P, Y300L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, P396L; IgG1-F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L; e IgG1-G236A, S239D, I332E; en donde la numeración de los residuos es aquella del índice EU de Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Quinta edición, incorporado en este documento a manera de referencia).

En otras modalidades, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un dominio efector de inmunoglobulina que ha sido modificada para disminuir la ADCP (véase, por ejemplo, Sazinsky y colaboradores, *PNAS* 105:20167-20172 (2008); Davis y colaboradores, *J. Rheumatol.* 34:2204-2210 (2007); Bolt y colaboradores, *Eur. J. Immunol.* 23:403-411 (1993); Alegre y colaboradores, *Transplantation* 57:1537-1543 (1994); Xu y colaboradores, *Cell Immunol.* 200:16-20 (2000); Cole y colaboradores, *Transplantation* 68:563-571 (1999); Hutchins y colaboradores, *PNAS* 92:11980-11984 (1995); Reddy y colaboradores, *J. Immunol.* 164:1925-1933 (2000), documentos WO 97/11971; WO 07/106585; US 2007/0148167A1, McEarchern y colaboradores, *Blood* 109:1185-1192 (2007); Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20:685-691 (2009) y Kumagai y colaboradores, *J. Clin. Pharmacol.* 47:1489-1497 (2007), los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad). A

manera de ejemplo, las proteínas de fusión de DBDpp pueden contener un fragmento o dominio de anticuerpo que contiene una o más de las siguientes modificaciones que disminuyen la ADCC: IgG1-N297A; IgG1-L234A, L235A; IgG2-V234A, G237A; IgG4-L235A, G237A, E318A; IgG4-S228P, L236E; secuencia EU IgG2 118-260; secuencia EU IgG4 261-447; IgG2-H268Q, V309L, A330S, A331S; IgG1-C220S, C226S, C229S, P238S; IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A; e IgG1-L234F, L235E, P331S; en donde la numeración de los residuos es aquella del índice UE de Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Quinta edición, incorporado en este documento a manera de referencia).

En modalidades adicionales, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio efector de inmunoglobulina, o un derivado de un dominio efector de inmunoglobulina, que confiere citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) a la proteína de fusión de DBDpp. En modalidades adicionales, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un dominio efector de inmunoglobulina que ha sido modificada para incrementar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (véase, por ejemplo, Idusogie y colaboradores, *J. Immunol.* 166:2571-2575 (2001); Strohl, *Curr. Op. Biotechnol* 20:685-691 (2009); y Natsume y colaboradores, *Cancer Res.* 68:3863-3872 (2008), los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad). A manera de ejemplo, las proteínas de fusión de DBDpp pueden contener un fragmento o dominio de anticuerpo que contiene una o más de las siguientes modificaciones que incrementan la CDC: IgG1-K326A, E333A; IgG1-K326W, E333S, IgG2-E333S; en donde la numeración de los residuos es aquella del índice EU de Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Quinta edición, incorporado en este documento a manera de referencia).

En modalidades adicionales, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio efector de inmunoglobulina, o un derivado de un dominio efector de inmunoglobulina, que confiere la capacidad para unir un receptor de FcγRIIb a la fusión de DBDpp. En modalidades adicionales, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un dominio efector de inmunoglobulina que ha sido modificada para incrementar la unión inhibitoria al receptor de FcγRIIb (véase, por ejemplo, Chu y colaboradores, *Mol. Immunol.* 45:3926-3933 (2008)). Un ejemplo de una modificación de diseño de fragmentos de inmunoglobulina contenida en una secuencia de aminoácidos en una proteína de fusión de DBDpp que incrementa la unión al receptor de FcγRIIb inhibitorio es IgG1-S267E, L328F.

En otras modalidades, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un dominio efector de inmunoglobulina que ha sido modificada para disminuir la CDC (véase, por ejemplo, documentos WO 97/11971; WO 07/106585, US 2007/0148167A1; McEarchern y colaboradores, *Blood* 109:1185-1192 (2007); Hayden-Ledbetter y colaboradores, *Clin. Cancer* 15:2739-2746 (2009); Lazar y colaboradores, *PNAS* 103:4005-4010 (2006); Bruckheimer y colaboradores, *Neoplasia*. 11:509-517 (2009); Strohl, *Curr. Op. Biotechnol* 20:685-691 (2009); y Sazinsky y colaboradores, *PNAS* 105:20167-20172 (2008), los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad). A manera de ejemplo, las proteínas de fusión de DBDpp pueden contener un fragmento o dominio de anticuerpo que contiene una o más de las siguientes modificaciones que disminuyen la CDC: IgG1-S239D, A330L, I332E; IgG2-118-260; IgG4-261-447; IgG2-H268Q, V309L, A330S, A331S; IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A; IgG1-L234F, L235E, P331S; e IgG1-C226S, P230S; en donde la numeración de los residuos es aquella del índice EU de Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Quinta edición, incorporado en este documento a manera de referencia).

La vida media de una IgG es mediada por su unión dependiente del pH al receptor neonatal FcRn. En ciertas modalidades, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio efector de inmunoglobulina, o un derivado de un dominio efector de inmunoglobulina, que confiere la capacidad para unir el receptor neonatal FcRn a la fusión de DBDpp. En ciertas modalidades una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un dominio de unión de FcRn de inmunoglobulina que ha sido modificada para mejorar la unión al FcRn (véase, por ejemplo, Petkova y colaboradores, *Int. Immunol.* 18:1759-1769 (2006); Dall'Acqua y colaboradores, *J. Immunol.* 169:5171-5180 (2002); Oganessian y colaboradores, *Mol. Immunol.* 46:1750-1755 (2009); Dall'Acqua y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 281:23514-23524 (2006), Hinton y colaboradores, *J. Immunol.* 176:346-356 (2006); Datta-Mannan y colaboradores, *Drug Metab. Dispos.* 35:86-94 (2007); Datta-Mannan y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 282:1709-1717 (2007); WO 06/130834; Strohl, *Curr. Op. Biotechnol.* 20:685-691 (2009); y Yeung y colaboradores, *J. Immunol.* 182:7663-7671 (2009) los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad).

En modalidades adicionales, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un dominio efector de inmunoglobulina que ha sido modificada para tener una afinidad selectiva por FcRn a pH 6,0, pero no a pH 7,4. A manera de ejemplo, las proteínas de fusión de DBDpp pueden contener un fragmento o dominio de anticuerpo que contiene una o más de las siguientes modificaciones que incrementan la vida media: IgG1-M252Y, S254T, T256E; IgG1-T250Q, M428L; IgG1-H433K, N434Y; IgG1-N434A; e IgG1-T307A, E380A, N434A; en donde la numeración de los residuos es aquella del índice EU de Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1991 Quinta edición, incorporado en este documento a manera de referencia).

En otras modalidades una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un dominio efector de inmunoglobulina que ha sido modificada para incrementar la unión al FcRn (véase, por ejemplo, Petkova y

colaboradores, *Int. Immunol.* 18:1759-1769 (2006); Datta-Mannan y colaboradores, *Drug Metab. Dispos.* 35:86-94 (2007); Datta-Mannan y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 282:1709-1717 (2007); Strohl, *Curr. Op. Biotechnol* 20:685-691 (2009); y Vaccaro y colaboradores, *Nat. Biotechnol.* 23:1283-1288 (2005), los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad). A manera de ejemplo, las proteínas de fusión de DBDpp pueden contener un fragmento o dominio de anticuerpo que contiene una o más de las siguientes modificaciones que disminuyen la vida media: IgG1-M252Y, S254T, T256E; H433K, N434F, 436H; IgG1-I253A; e IgG1-P257I, N434H y D376V, N434H; en donde la numeración de los residuos es aquella del índice EU de Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Quinta edición, incorporado en este documento a manera de referencia).

De acuerdo con otra modalidad, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a un dominio efector de inmunoglobulina que ha sido modificada para contener por lo menos una sustitución en su secuencia que corresponde a la posición de la región Fc (por ejemplo, FC gamma) seleccionada del grupo que consiste de: 238, 239, 246, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 y 439, en donde la numeración de los residuos en la región Fc es de acuerdo con el sistema de numeración UE; de Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Quinta edición, incorporado en este documento a manera de referencia). En una modalidad específica, la proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un derivado de dominio efector de inmunoglobulina en donde por lo menos un residuo que corresponde a la posición 434 es un residuo seleccionado del grupo que consiste de: A, W, Y, F y H. De acuerdo con otra modalidad, la proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un derivado de fragmento efector de inmunoglobulina que tiene las siguientes sustituciones respectivas S298A/E333A/K334A. En una modalidad adicional, la proteína de fusión de DBDpp comprende un derivado de dominio efector de inmunoglobulina que tiene una sustitución que corresponde a K322A. En otra modalidad, la proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un derivado de dominio efector de inmunoglobulina que tiene una o cualquier combinación de las siguientes sustituciones K246H, H268D, E283L, S324G, S239D e I332E. De acuerdo con todavía otra modalidad, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un derivado de dominio efector de inmunoglobulina que tiene sustituciones que corresponden a D265A/N297A.

En ciertas modalidades, una proteína de fusión de DBDpp comprende una secuencia de un dominio efector de inmunoglobulina que ha sido glicodiseñado o mutado para incrementar la función efectora utilizando técnicas conocidas en el campo. Por ejemplo, la inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de una secuencia de dominio de región constante contenida en un DBDpp puede reducir la unión de receptores de Fc de la proteína de fusión de DBDpp en circulación para incrementar en consecuencia la localización de tumores. En otros casos puede ser que las modificaciones de regiones constantes que son consistentes con ciertas modalidades de la presente invención moderen la unión al complemento y de esta manera reduzcan la vida media en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Todavía otras modificaciones de la región constante se pueden utilizar para modificar vinculaciones de disulfuro o porciones de oligosacáridos que permiten la localización mejorada debido a una especificidad por antígeno o flexibilidad de anticuerpo incrementadas. El perfil fisiológico, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos resultantes de las modificaciones, tal como la localización de tumor, biodistribución y vida media en suero, se pueden medir y cuantificar fácilmente utilizando técnicas inmunológicas bien conocidas sin experimentación indebida.

En ciertas modalidades una célula efectora inmune comprende un receptor de la superficie celular para una inmunoglobulina u otra molécula de unión de péptidos, tal como un receptor para una región constante de inmunoglobulina y que incluye la clase de receptores referidos comúnmente como "receptores de Fc" ("FcR"s). Una variedad de FcRs han sido caracterizados estructural y/o funcionalmente y son conocidos en el campo, que incluyen FcR que tienen capacidades específicas para interactuar con un subconjunto restringido de isotipos de cadena pesada de inmunoglobulina, o que interactúan con dominios Fc con afinidades variantes y/o los cuales se pueden expresar en subconjuntos restringidos de células efectoras inmunes bajo ciertas condiciones (por ejemplo, Kijimoto-Ochichai y colaboradores, *Cell Mol. Life. Sci.* 59:648 (2002); Davis y colaboradores, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 266:85 (2002); Pawankar, *Curr. Opin. Allerg. Clin. Immunol.* 1:3 (2001); Radaev y colaboradores, *Mol. Immunol.* 38:1073 (2002); Wurzburg y colaboradores, *Mol. Immunol.* 38:1063 (2002); Sulica y colaboradores, *Int. Rev. Immunol.* 20:371 (2001); Underhill y colaboradores, *Ann. Rev. Immunol* 20:825 (2002); Coggeshall, *Curr. Dir. Autoimm.* 5:1 (2002); Mimura y colaboradores, *Adv. Exp. Med. Biol.* 495:49 (2001); Baumann y colaboradores, *Adv. Exp. Med. Biol.* 495:219 (2001); Santos y colaboradores, *Ital. Heart J.* 2:811 (2001); Novak y colaboradores, *Curr. Opin. Immunol.* 13:721 (2001); Fossati y colaboradores, *Eur. J. Clin. Invest.* 31:821 (2001)), cada uno de los cuales se incorpora en este documento a manera de referencia en su totalidad.

Las células que tienen la capacidad de mediar la ADCC son ejemplos de células efectoras inmunes. Otras células efectoras inmunes incluyen células asesinas naturales, linfocitos T que infiltran tumores (TIL), linfocitos T citotóxicos y células granulocíticas tales como células que comprenden mecanismos de respuesta alérgica. Las células efectoras inmunes incluyen de esta manera, pero no están limitadas a, células de origen hematopoyético que incluyen células en varias etapas de diferenciación dentro de linajes mieloides y linfoides y las cuales pueden (pero no necesitan) expresar uno o más tipos de FcR funcionales de la superficie celular, tales como linfocitos T, linfocitos B, células NK,

monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, eritrocitos y precursores, progenitores (por ejemplo, células madre hematopoyéticas), así como también formas inactivas, activadas y maduras de estas células. Otras células efectoras inmunes pueden incluir células de origen no hematopoyético que tienen la capacidad de mediar funciones inmunes, por ejemplo, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, osteoclastos, células epiteliales y otras células. Las células efectoras inmunes también pueden incluir células que median eventos citotóxicos o citostáticos, o eventos endocíticos, fagocíticos o pinocitóticos, o que efectúan la inducción de la apoptosis, o que efectúan la inmunidad microbiana o neutralización de la infección microbiana, o células que median reacciones alérgicas, inflamatorias, de hipersensibilidad y/o autoinmunes.

DBDpp como Fusiones de Albúmina

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión de DBDpp-albúmina también están comprendidas en este documento, ya que son vectores que contienen estos ácidos nucleicos, células hospedantes que contienen estos vectores de ácidos nucleicos, y métodos para hacer las proteínas de fusión de DBDpp-albúmina y utilizar estos ácidos nucleicos, vectores y/o células hospedantes. La invención también comprende formulaciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de DBDpp-albúmina y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Estas formulaciones se pueden utilizar en métodos para tratar, prevenir, mejorar o diagnosticar una enfermedad o síntoma de enfermedad en un paciente, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, que comprende el paso de administración de la formulación farmacéutica al paciente.

DBDpp como Receptores Quiméricos

Además de la incorporación de DBD en proteínas solubles de múltiples dominios, la presente invención proporciona un medio mediante el cual se crean DBDpp asociados con células, comprendidos de por lo menos un DBDpp diseñado para conferir especificidad de unión a una proteína de fusión unida a la membrana. Los DBDpp-receptores pueden ser expresados por cualquier tipo de célula.

En una modalidad, la proteína de fusión de DBDpp-receptor comprende un receptor antigénico quimérico (CAR), o DBDpp-CAR, compuesto de los siguientes elementos: un dominio de fijación de objetivos extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático en donde el dominio citoplásmico comprende el dominio de señalización. En otra modalidad el DBDpp-CAR está compuesto de un dominio de fijación de objetivos extracelular y un dominio transmembrana. En una modalidad adicional el DBDpp-CAR está comprendido de un dominio extracelular compuesto de uno o más DBDpp, en el cual cada DBDpp constituye un dominio de unión específico para un objetivo con las mismas o diferentes especificidades. En varias modalidades, el dominio específico para un objetivo se dirige a uno (o más) de los antígenos cancerosos o tumorales dados a conocer en este documento, tales como CD123, CD137, PD-L1, CD19, CD22, NY-ESO o MAGE A3, como ejemplos no limitantes. En una modalidad, el dominio intracelular (por ejemplo, el dominio citoplásmico) del DBDpp-CAR comprende el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3. En otra modalidad, el dominio de señalización intracelular del DBDpp está comprendido de parte del dominio intracelular de la cadena zeta de CD3. En una modalidad adicional, el dominio intracelular del DBDpp-CAR comprende el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 y una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del DBDpp-CAR que comprende la totalidad o parte del dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular diferentes de receptores de antígenos o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficiente de linfocitos a un antígeno. Las moléculas coestimuladoras y porciones de estas moléculas que tienen la capacidad de conferir propiedades coestimuladoras a un CAR son conocidas en el campo y se pueden incorporar de manera rutinaria en el DBDpp-CAR. Además, truncamientos o una mutación a esos dominios de señalización intracelular y coestimuladores se pueden incorporar para mejorar o reducir adicionalmente la señalización de receptores. En modalidades preferidas, una célula T se modifica genéticamente para que exprese de manera estable un DBDpp-CAR. En estas modalidades el dominio citoplásmico del DBDpp-CAR se puede diseñar para que comprenda el dominio de señalización CD28 y/o 4-1BB por sí mismo o se combine con cualquier otro dominio citoplásmico deseado que sea útil en el contexto de la invención. En una modalidad, el dominio citoplásmico del DBDpp-CAR se puede diseñar para que comprenda además el dominio de señalización de CD3-zeta. Por ejemplo, como se representa esquemáticamente en la FIGURA 5B, en una modalidad, el DBDpp-CAR comprende un dominio de fijación de objetivos extracelular, un conector de proteínas extracelular con un dominio transmembrana que pasa a través de la membrana celular (tal como se encuentra en células T o células NK) y un dominio citoplásmico, que comprende opcionalmente múltiples módulos de señalización. En varias modalidades, el DBDpp-CAR también puede comprender una marca de epítipo. En varias modalidades, el dominio citoplásmico del DBDpp-CAR puede incluir pero no está limitado a los módulos de señalización CD3-zeta, 4-1BB y CD28 y combinaciones de los mismos.

Dominio Extracelular

Dependiendo del antígeno deseado que es fijado como objetivo, el DBDpp-CAR se puede diseñar para que incluya el DBDpp que se une a un antígeno apropiado que es específico para el objetivo antigénico deseado. Por ejemplo, si CD19 es el antígeno deseado que debe ser fijado como objetivo, uno o más DBDpp que se unen a CD19 se pueden incorporar en el dominio de unión específico para un objetivo del DBDpp-CAR. Alternativamente el DBDpp-CAR puede incluir más de un DBDpp, que confiere multi-especificidad o multi-valencia al DBDpp-CAR.

La elección del DBDpp incorporado en el dominio extracelular del receptor de DBDpp (por ejemplo, DBDpp-CAR) depende de la identidad de la célula o células que son fijadas como objetivo. Por ejemplo, un DBDpp-CAR puede unirse específicamente a proteínas de la superficie celular tal como un receptor en la misma célula u otra célula. En otras modalidades, el DBDpp-CAR se une específicamente a una molécula soluble, tal como una inmunoglobulina. En otras modalidades los objetivos de interés unidos por el DBDpp-CAR incluyen aquellos asociados con infecciones, enfermedades y trastornos virales, bacterianos y parasíticos del sistema inmune (por ejemplo, enfermedad autoinmune).

En otras modalidades, un DBDpp-CAR se puede seleccionar para reconocer un ligando que actúa como un marcador de la superficie celular en células objetivo asociadas con un cáncer. En algunas modalidades un DBDpp-CAR puede fijar como objetivo y unirse a un antígeno tumoral (por ejemplo, un TAA u otro antígeno tumoral descrito en este documento o conocido de otra manera en el campo). Por consiguiente, en este documento se proporcionan métodos para crear un DBDpp-CAR, su uso en la creación de células quiméricas tales como, células T de humano y células asesinas naturales y el uso de esas células T quiméricas en la inmunoterapia adoptiva.

En el contexto proporcionado en este documento, un "antígeno tumoral" se refiere a antígenos que son comunes para trastornos hiperproliferativos específicos tal como el cáncer. Los antígenos tumorales que pueden ser unidos específicamente por un DBDpp en un DBDpp-CAR se dan a conocer en este documento. En una modalidad, un DBDpp en un DBDpp-CAR se une específicamente a un antígeno específico de un tumor (TSA) o un antígeno asociado con un tumor (TAA). Un TSA es único para células tumorales y no aparece en otras células en el cuerpo. Un antígeno asociado con TAA no es único para una célula tumoral y en lugar de eso también es expresado en una célula normal bajo condiciones que no provocan un estado de tolerancia inmunológica al antígeno. La expresión del antígeno en el tumor puede ocurrir bajo condiciones que hacen posible que el sistema inmune responda al antígeno. Los TAAs pueden ser antígenos que son expresados en células normales durante el desarrollo fetal cuando el sistema inmune es inmaduro e incapaz de responder o pueden ser antígenos que están presentes normalmente a niveles extremadamente bajos en células normales pero los cuales son expresados a niveles mucho más altos en células tumorales. Los ejemplos no limitantes de antígenos de TSA o TAA que pueden ser unidos específicamente por un DBDpp en un DBDpp-CAR incluyen un miembro seleccionado de: un antígeno de diferenciación tal como MART1/MelanA (MART1), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP1, TRP2; un antígeno multi-linaje específico para un tumor tal como MAGE1, MAGE3, BAGE, GAGE1, GAGE2, p15; un antígeno embrionario sobreexpresado tal como CEA; y un oncogén sobreexpresado o gen supresor de tumores mutado tal como p53, Ras, HER-2/neu; un antígeno tumoral único que resulta del desplazamiento cromosómico tal como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, 1GH-IGK, MYL-RAR; un antígeno viral, tal como los antígenos del virus Epstein Barr EBVA y los antígenos de virus de papiloma humano (VPH) E6 y E7; TSP-180, MAGE4, MAGE5, MAGE6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB3, cmet, nm-23H1, PSA, TAG72, CA 19-9, CA72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-Catenina, CDK4, Mum-1, p15, p16, 43-9F, 5T4(791Tgp72) alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA125, CA 15-3/CA 27.29/BCAA, CA195, CA242, CA50, CAM43, CD68/CD33, CO-029, FGF5, G250, Ga733VEpCAM, HTgp-175, M344, MA50, MG7-Ag, MOV 18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA90/Mac-2, TAAL6, TAG72, TLP y TPS; un antígeno asociado con un glioma, un antígeno carcinoembrionario (CEA), β -gonadotropina coriónica de humano, alfa-fetoproteína (AFP), AFP reactiva a lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, telomerasa transcriptasa inversa de humano, RU1, RU2 (AS), carboxilesterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno específico de la próstata (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prosteína, PSMA, Her2/neu, survivina y telomerasa, antígeno tumoral de carcinoma de próstata-1 (PCTA1), MAGE, ELF2M, neutrófilo elastasa, efrinB2, TACI (CD267), BAFF-R (CD268), BCMA (CD269), TLR4, factor de crecimiento de insulina (IGF)I, IGFII, receptor de IGF-I y mesotelina.

En una modalidad particular, un DBDpp en la porción de grupo de unión a antígenos de un DBDpp-CAR se une específicamente a un objetivo seleccionado de: CD123, HVEM, BTLA, DR3, CD19, CD20, CD22, ROR 1, Mesotelina, CD33/IL3Ra, cMet, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD2, MY-ESO-1TCR, CD133, CD47 y MAGE A3 TCR. En otra modalidad preferida, el DBDpp en la porción de grupo de unión a antígenos de un DBDpp-CAR se une específicamente a toda clase de inmunoglobulina o isotipos, alotipos o idiotipos específicos.

En una modalidad, un DBDpp en un DBDpp-CAR se une específicamente a un antígeno tumoral asociado con un tumor maligno. Los tumores malignos expresan una variedad de antígenos tumorales para los cuales son DBDpp-CAR se puede diseñar para unirse. En una modalidad, un DBDpp de un DBDpp-CAR se une a un antígeno seleccionado de: un antígeno específico de tejido tal como MART-1, tirosinasa y GP 100 en melanoma y fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno específico de próstata (PSA) en cáncer de próstata; una molécula relacionada con la transformación tal como el oncogén HER2/Neu ErbB2; un antígeno onco-fetal tal como el antígeno carcinoembrionario (CEA); una inmunoglobulina de idiotipo específico para linfoma de células B; un antígeno de diferenciación de células B tal como CD19, CD20 y CD37; TSLPR e IL-7R en células mieloides y antígenos testiculares de cáncer (CT) (por ejemplo, NY-ESO-1, LAGE-1a), CS-1, CD38, CD138, MUC1, HM1.24, CYP1B1, SP17, PRAME, tumor de Wilms 1 (WT1) y proteína de choque térmico gp96 en células de mieloma múltiple.

Dominio Transmembrana

Un "dominio transmembrana" (TMD) como se utiliza en este documento se refiere a la región de una proteína de fusión

de DBDpp expresada en la superficie celular tal como un DBDpp-CAR, que cruza la membrana plasmática. En algunas modalidades, el dominio transmembrana del DBDpp-CAR es la región transmembrana de una proteína transmembrana (por ejemplo proteínas transmembrana Tipo I), una secuencia hidrófoba artificial o una combinación de las mismas. Otros dominios transmembrana serán aparentes para aquellas personas de experiencia en el campo y se pueden utilizar en relación con modalidades alternativas de la invención.

El receptor de DBDpp (por ejemplo, DBDpp-CAR) se puede diseñar para que contenga un dominio transmembrana que se fusiona al dominio extracelular del receptor de DBDpp. Como se describiera anteriormente, la fusión de los dominios extracelular y transmembrana se puede realizar con o sin un conector. En una modalidad, se utiliza el dominio transmembrana que se asocia naturalmente con uno de los dominios en el DBDpp-CAR. En una modalidad específica, el dominio transmembrana en el DBDpp-CAR es el dominio transmembrana CD8. En algunos casos, el dominio transmembrana del DBDpp-CAR comprende el dominio bisagra de CD8. En algunas modalidades, el dominio transmembrana se debe seleccionar o modificar por medio de una sustitución de aminoácido para promover o inhibir la asociación con otras proteínas de la membrana superficial.

El dominio transmembrana se puede derivar ya sea de una fuente natural o de una fuente sintética. Donde la fuente es natural, el dominio se puede derivar de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana de uso particular para los fines descritos en este documento se pueden derivar de (es decir, pueden comprender por lo menos la(s) región(es) transmembrana de) un miembro seleccionado del grupo: la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T; CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. Alternativamente, el dominio transmembrana puede ser sintético, caso en el cual el dominio transmembrana de DBDpp-CAR comprenderá residuos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. En modalidades adicionales, el dominio transmembrana comprende el triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético.

El "dominio separador extracelular" (ESD, por sus siglas en inglés) como se utiliza en este documento se refiere a la región hidrófila la cual está entre la región de fijación como objetivo específica de un antígeno y el dominio transmembrana. En algunas modalidades, el DBDpp-CAR comprende un dominio separador extracelular. En otras modalidades, el DBDpp-CAR no comprende un dominio separador extracelular. Los dominios separadores extracelulares incluyen pero no están limitados a fragmentos Fc de anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos, regiones bisagra de anticuerpos o fragmentos o derivados de las mismas, regiones CH2 de anticuerpos, regiones CH3 de anticuerpos, secuencias separadoras artificiales o combinaciones de las mismas. Los ejemplos adicionales de dominios separadores extracelulares incluyen, pero no están limitados a, bisagra de CD8a, y separadores artificiales hechos de polipéptidos los cuales pueden ser tan pequeñas como, por ejemplo, Gly3 o dominios CHI y CH3 de IgGs (tal como IgG4 de humano). En algunas modalidades, el dominio separador extracelular es cualquiera de uno o más de (i) una bisagra, regiones CH2 y CH3 de IgG4, (ii) una región de bisagra de IgG4, (iii) una bisagra y CH2 de IgG4, (iv) una región bisagra de CD8a, (v) una bisagra, regiones CH2 y CH3 de IgG1, (vi) una región bisagra de IgG1 o (vi) una bisagra y una región CH2 de IgG1. Otros dominios separadores extracelulares serán aparentes para aquellas personas de experiencia en el campo y se pueden utilizar en relación con modalidades alternativas proporcionadas en este documento.

En algunas modalidades, un conector de oligo- o polipéptido corto, de aproximadamente 1 a 100 aminoácidos de longitud, se utiliza para vincular conjuntamente cualquiera de los dominios de un DBDpp-CAR. Los conectores pueden estar compuestos de residuos flexibles como glicina y serina (o cualquier otro aminoácido) de modo que los dominios de proteínas adyacentes estén libres para moverse uno en relación con el otro. La composición de secuencia de aminoácidos del conector se puede seleccionar para minimizar la inmunogenicidad potencial del DBDpp-CAR o proteína de fusión de DBDpp. Se pueden utilizar conectores más largos cuando es deseable asegurar que dos dominios adyacentes no interfieran estéricamente entre sí. En algunas modalidades, preferiblemente entre 2 y 10 aminoácidos de longitud forman el vínculo entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplásmico del DBDpp-CAR. En modalidades adicionales, el conector está entre 10 y 15 aminoácidos de longitud, o entre 15 y 20, o entre 20 y 30, o entre 30 y 60, o entre 60 y 100 aminoácidos de longitud (o cualquier intervalo entre aquellos listados). En modalidades adicionales, el conector es una secuencia de dobles de glicina-serina. Las modalidades adicionales emplean un fragmento de la región de bisagra derivada de la cadena alfa de CD8 de glicoproteína superficial de células T de humano (por ejemplo, que varía de las posiciones de aminoácidos 138 a 182 de la cadena alfa de CD8; número de acceso de Swiss-Prot P01732). Las modalidades adicionales emplean un fragmento de la región bisagra de CD8 que ha sido modificado adicionalmente, a través de la sustitución de aminoácidos, para mejorar la función de expresión o inmunogenicidad. Las modalidades adicionales emplean un fragmento de la región extracelular derivada de la CD28 de humano. Las modalidades adicionales emplean un fragmento de la región extracelular de CD28 que ha sido modificado adicionalmente, a través de la sustitución de aminoácidos, para mejorar la función de expresión o inmunogenicidad.

Dominio Intracelular

Un "dominio de señalización intracelular" (ISD, por sus siglas en inglés) o "dominio citoplásmico" como se utiliza en este documento se refiere a la porción del DBDpp-CAR que transduce la señal de función efectora y dirige la célula para que realice su función especializada. El dominio citoplásmico (es decir, dominio de señalización intracelular) de

un DBDpp-CAR es responsable de la activación de por lo menos una de las funciones efectoras normales de una célula inmune diseñada para expresar un DBDpp-CAR. El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, incluye actividad citolítica y actividad auxiliar que incluye la secreción de citocinas. De esta manera el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína de DBDpp-CAR que transduce la señal de función efectora y dirige la célula para que realice una función especializada. Mientras que típicamente se puede emplear el dominio de señalización intracelular completo que corresponde a un receptor de origen natural, en muchos casos no es necesario utilizar la cadena completa. Al grado que se utiliza una porción truncada del dominio de señalización intracelular, esta porción truncada se puede utilizar en lugar de la cadena intacta siempre y cuando transduzca la señal de función efectora. De esta manera el término dominio de señalización intracelular se propone para incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora. En una modalidad, un dominio de señalización intracelular en el DBDpp-CAR incluye las secuencias citoplásmicas del receptor de células T (TCR) y también la secuencia de co-receptores que actúan en colaboración para iniciar la transducción de señales que sigue al acoplamiento de receptores de antígenos, o cualquier derivado o variante de esas secuencias que tenga capacidad funcional. Los ejemplos de dominios que transducen una señal de función efectora incluyen pero no están limitados a la cadena ζ del complejo de receptores de células T o cualquiera de sus homólogos (por ejemplo, cadena η , Fc γ Rly y cadenas β , cadena de MB 1 (Iga), cadena de B29 (Ig), etcétera), cadena zeta de CD3 de humano, polipéptidos de CD3 (Δ , δ y ϵ), tirosina cinasas de la familia syk (Syk, ZAP 70, etcétera), tirosina cinasas de la familia src (Lck, Fyn, Lyn, etcétera) y otras moléculas involucradas en la transducción de células T, tales como CD2, CD5 y CD28.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación completa de la célula T y que también se requiere una señal secundaria o co-estimuladora. De esta manera, se puede decir que la activación de células T es mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplásmica: aquellas que inician la activación primaria dependiente de antígenos a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmática primaria) y aquellas que actúan de una manera independiente de antígenos para proporcionar una señal secundaria o co-estimuladora (secuencias de señalización citoplasmática secundaria).

Las secuencias de señalización citoplasmática primaria regulan la activación primaria del complejo de TCR ya sea de una manera estimuladora, o de una manera inhibitoria. Las secuencias de señalización citoplasmática primaria que actúan de una manera estimuladora pueden contener motivos de señalización los cuales son conocidos como motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAMs, por sus siglas en inglés).

Los ejemplos de secuencias de señalización citoplasmática primaria que contienen ITAM que son de uso particular en la invención incluyen aquellas derivadas de TCR zeta, Fc γ R gamma, Fc γ R beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. Se prefiere particularmente que la molécula de señalización citoplásmica en el CAR comprenda una secuencia de señalización citoplásmica derivada de CD3 zeta.

Un "dominio co-estimulador" (CSD, por sus siglas en inglés), como se utiliza en este documento se refiere a la porción de un CAR o DBDpp-CAR que mejora la proliferación, supervivencia y/o desarrollo de células de memoria. El DBDpp-CAR puede comprender uno o más dominios co-estimuladores. Cada dominio coestimulador comprende el dominio coestimulador de cualquiera o de uno o más de, por ejemplo, un miembro de la superfamilia de TNFR, seleccionado de CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD1 la/CD 18), Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30 y CD40 o una combinación de los mismos. Otros dominios co-estimuladores (por ejemplo, de otras proteínas) serán aparentes para aquellas personas de experiencia en el campo y se pueden utilizar en relación con modalidades alternativas de la invención.

En una modalidad preferida, el dominio citoplásmico de un DBDpp-CAR comprende el dominio de señalización de CD3-zeta por sí mismo o combinado con cualquier otro dominio citoplásmico deseado que sea útil en el contexto del DBDpp-CAR. Por ejemplo, el dominio citoplásmico del DBDpp-CAR puede comprender una porción de cadena zeta de CD3 y una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de la superficie celular diferente de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta eficiente de linfocitos a un antígeno. Los ejemplos de estas moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD 137), OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, antígeno asociado con la función de linfocitos-1 (LFA1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7H3, T1M1 y LAG-3.

Los conectores de polipéptidos se pueden colocar entre elementos adyacentes del DBDpp-CAR. Por ejemplo los conectores se pueden colocar entre DBDpp adyacentes o entre DBDpp y el dominio transmembrana o entre el dominio transmembrana y el dominio citoplásmico o entre dominios citoplásmicos adyacentes. Las secuencias de señalización citoplásmicas dentro de la porción de señalización citoplásmica del DBDpp-CAR se pueden vincular entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un conector corto, preferiblemente entre 2 y 10 aminoácidos de longitud puede formar el vínculo. Un doblete de glicina-serina proporciona un conector particularmente adecuado.

Marca de Epítipo

En algunas modalidades, una proteína de fusión de DBDpp comprende una marca de epítipo de péptido. En algunas modalidades, la marca de péptido se selecciona del grupo que consiste de una marca de hexahistidilo (His6), una marca de myc y una marca FLAG. En modalidades adicionales, las marcas de péptidos incluyen, pero no están limitadas a, avitag (permite la biotilación de la marca y el aislamiento con estreptavidina), calmodulina, marca E, hemaglutinina (HA), marca S, marca SBP, softag 1, estreptavidina, tetra o poli-cisteína, V5, VSV y marca Xpress. Adicionalmente se pueden utilizar marcas de polihistidilo (diferentes de 6 residuos). En modalidades adicionales, se pueden utilizar marcas de péptidos covalentes, marcas de proteínas y similares. Las marcas de péptidos covalentes incluyen, pero no están limitadas a, isopeptag (se une covalentemente a la proteína pilinC), Spytag (se une covalentemente a la proteína SpyCatcher) y Snooptag (se une covalentemente a la proteína SnoopCatcher). En modalidades aún adicionales, las marcas de proteínas, que incluyen pero no están limitadas a proteína portadora de biotina-carboxilo (BCCP, por sus siglas en inglés), glutatona-s-transferasa, proteína fluorescente verde (u otro fluoróforo), marca Halo, marca Nus, tioredoxina, marcas Fc se pueden utilizar opcionalmente. En modalidades aún adicionales, se pueden utilizar múltiples tipos de marcas. En modalidades aún adicionales, no se utiliza una marca. Se puede utilizar cualquier combinación de dominios extracelulares, transmembrana e intracelulares dados a conocer en este documento, dependiendo de la modalidad.

Conectores

Los términos "conector" y separador se utilizan de manera intercambiable en este documento para referirse a un péptido u otro vínculo químico que funciona para vincular dominios funcionales de otra manera independientes. En una modalidad, un conector en un DBDpp se ubica entre un DBDpp y otro componente de polipéptido que contiene un dominio funcional de otra manera independiente. Los conectores adecuados para el acoplamiento de dos o más DBDpp vinculados serán claros para las personas expertas en el campo y pueden ser generalmente cualquier conector utilizado en el campo para vincular péptidos, proteínas u otras moléculas orgánicas. En modalidades particulares, este conector es adecuado para construir proteínas o polipéptidos que se proponen para el uso farmacéutico.

Los conectores adecuados para vincular de manera operable un DBDpp y un componente adicional de una proteína de fusión de DBDpp en una secuencia de aminoácidos de cadena individual incluyen pero no están limitados a, conectores de polipéptidos tales como conectores de glicina, conectores de serina, conectores mezclados de glicina/serina, conectores ricos en glicina y serina o conectores compuestos de fragmentos de polipéptidos polares en gran medida.

En una modalidad, el colector está constituido de una mayoría de aminoácidos seleccionados de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. En una modalidad, el conector está constituido de una mayoría de aminoácidos seleccionados de glicina, alanina, prolina, asparagina, ácido aspártico, treonina, glutamina y lisina. En una modalidad, el conector de proteína de fusión de DBDpp está constituido de uno o más de los aminoácidos seleccionados de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. En una modalidad, el conector de proteína de fusión de DBDpp está constituido de uno o más de los aminoácidos seleccionados de glicina, alanina, prolina, asparagina, ácido aspártico, treonina, glutamina, y lisina. En otra modalidad, el conector de proteína de fusión de DBDpp está constituido de una mayoría de aminoácidos que no están impedidos estéricamente. En otra modalidad, un conector en el cual la mayoría de aminoácidos son glicina, serina y/o alanina. En algunas modalidades, el conector de péptido se selecciona de poliglicinas (tales como (Gly) 5 y (Gly) 8, poli (Gly-Ala) y polialaninas. En algunas modalidades, el conector de péptido contiene la secuencia de Gly-Gly-Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser. En algunas modalidades, el conector de péptido contiene la secuencia de Gly-Gly-Gly-Gly-Asp-Gly-Gly-Gly-Ser.

En una modalidad, una fusión de DBDpp comprende un DBDpp adherido directamente (es decir, sin un conector) a otro componente de la proteína de fusión de DBDpp. En una modalidad, una fusión de DBDpp comprende por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, DBDpp adheridos directamente a otro componente de la fusión de DBDpp.

En otra modalidad, un DBDpp se puede vincular de manera operable a otro componente de una proteína de fusión de DBDpp a través de un conector. Las proteínas de fusión de DBDpp pueden contener un conector individual, múltiples conectores o pueden no contener conectores. En una modalidad, una fusión de DBDpp contiene un DBDpp vinculado de manera operable a otro componente de la proteína de fusión de DBDpp a través de un péptido conector. En una modalidad, una fusión de DBDpp comprende por lo menos 2, 3, 4 o 5 DBD vinculados de manera operable a otro componente de la proteína de fusión de DBDpp a través de un péptido conector.

Los conectores pueden ser de cualquier tamaño o composición siempre y cuando tengan la capacidad de vincular de manera operable un DBDpp de una manera que haga posible que el DBDpp se una a un objetivo de interés. En algunas modalidades, los conectores son de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 aminoácidos, de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos, de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, de aproximadamente 1 a 15 aminoácidos, de aproximadamente 1 a 10 aminoácidos, de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 20 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 15 aminoácidos, de aproximadamente 2 a 10 aminoácidos o de aproximadamente de 2 a 5 aminoácidos. Debe ser claro que la longitud, el grado de flexibilidad y/u otras propiedades del(los) conector(es) pueden tener la misma influencia sobre las propiedades del polipéptido final de la invención, que incluyen pero no están limitadas a la afinidad, especificidad o aidez por un objetivo de interés, o por una o más de otras proteínas objetivo de interés. Cuando se utilizan dos o más conectores en las proteínas de fusión de DBDpp,

estos conectores pueden ser los mismos o diferentes. En el contexto y descripción proporcionados en este documento, una persona experta en el campo será capaz de determinar de manera rutinaria la composición y longitud óptimas de los conectores con el propósito de vincular de manera operable un DBDpp y otros componentes de una proteína de fusión de DBDpp.

El conector también puede ser un conector distinto de péptido tal como un conector de alquilo o un conector de PEG. Por ejemplo, se pueden utilizar conectores de alquilo tal como $-NH-(CH_2)_s-C(0)-$, en donde $s = 2-20$. Estos conectores de alquilo pueden ser sustituidos adicionalmente por cualquier grupo no impedidor estéricamente tal como alquilo inferior (por ejemplo, acilo inferior (de 1 a 6 átomos de carbono), halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH_2 , fenilo, etcétera. Un conector distinto de péptido ejemplar es un conector de PEG. En ciertas modalidades, el conector de PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 100 a 5000 kDa, o de aproximadamente 100 a 500 kDa.

Los conectores adecuados para el acoplamiento de DBDpp y componentes de proteínas de fusión de DBDpp por medio de la reticulación química incluyen, pero no están limitados a, compuestos de reticulación química homobifuncionales tales como glutaraldehído, imidoésteres tal como adipimidato de dimetilo (DMA), suberimidato de dimetilo (DMS) y pimelimidato de dimetilo (DMP) o ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), tales como ditiobis (succinimidilpropionato) (DSP) y ditiobis (sulfosuccinimidilpropionato) (DTSSP). Los ejemplos de conectores adecuados para el acoplamiento de DBDpp y componentes de proteínas de fusión de DBDpp de reactivos heterobifuncionales para la reticulación incluyen, pero no están limitados a, reticuladores con un extremo reactivo con amina y un grupo reactivo con sulfhidrilo en el otro extremo, o con un éster de NHS en un extremo y un grupo reactivo con SH (por ejemplo, una maleimida o un piridilo).

En modalidades adicionales, uno o más de los conectores en la proteína de fusión de DBDpp son escindibles. Los ejemplos de conectores escindibles incluyen, sin limitación, una secuencia de péptidos reconocida por proteasas (in vitro o in vivo) de tipo variante, tal como T_{ev}, trombina, factor Xa, plasmina (proteasas de la sangre), metaloproteasas, catepsinas (por ejemplo, GFLG, etcétera) y proteasas encontradas en otros compartimientos corporales.

En una modalidad, el conector es un "conector escindible" que facilita la liberación de un DBDpp o un agente citotóxico en una célula. Por ejemplo, se puede utilizar un conector lábil al ácido (por ejemplo, hidrazona), un conector sensible a proteasa (por ejemplo, sensible a peptidasa), un conector fotolábil, un conector de dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari, Can. Res. 52:127-131 (1992); patente de los Estados Unidos No. 5.208.020; Publicación de la Solicitud de los Estados Unidos No. 20090110753; cada uno incorporado a manera de referencia en su totalidad) en donde es deseable que la adherencia covalente entre un DBDpp o un agente citotóxico y el asociado de fusión sea escindida intracelularmente cuando la composición es interiorizada en la célula. Los términos "escindido intracelularmente" y "escisión intracelular" se refieren a un proceso o reacción metabólico dentro de una célula en un conjugado de fármaco de DBDpp por medio del cual la adherencia covalente, es decir, vinculado a través de un conector entre el DBDpp y el agente citotóxico, el DBDpp y el asociado de fusión, o entre dos DBDpp se rompe, dando por resultado el DBDpp libre y/o el agente citotóxico disociado dentro de la célula.

La optimización del conector se puede evaluar utilizando técnicas descritas en este documento y/o conocidas de otra manera en el campo. En algunas modalidades, los conectores no alteran la capacidad de un DBDpp para unir una molécula objetivo y/u otro componente de proteína de fusión de DBDpp tal como un dominio o fragmento de anticuerpo para la unión a un antígeno.

DBDpp como Conjugados Químicos

Los DBDpp que promueven la unión específica a objetivos de interés se pueden conjugar químicamente con una variedad de compuestos tales como tintes fluorescentes, radioisótopos, composiciones de cromatografía (por ejemplo, cuentas, resinas, geles, etcétera) y agentes quimioterapéuticos. Los conjugados de DBDpp tienen usos que incluyen pero no están limitados a las aplicaciones de purificación, diagnóstico, analíticas, de manufactura y terapéuticas.

La falta inherente de cisteínas en la secuencia de DBD proporciona la oportunidad para la introducción de cisteínas únicas con fines de conjugación específica para un sitio.

En algunas modalidades, el DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) contiene por lo menos un residuo reactivo. Los residuos reactivos son útiles, por ejemplo, como sitios para la adherencia de conjugados tales como fármacos quimioterapéuticos. El residuo reactivo puede ser, por ejemplo, una cisteína, una lisina u otro residuo reactivo. De esta manera, una cisteína se puede agregar a un DBDpp en la terminal ya sea N o C, o dentro de la secuencia de DBDpp. Una cisteína puede ser sustituida por otro aminoácido en la secuencia de un DBDpp. Además, una lisina se puede agregar a un DBDpp en cualquier extremo o dentro de la secuencia de DBDpp y/o una lisina puede ser sustituida por otro aminoácido en la secuencia de un DBDpp. En una modalidad, un residuo reactivo (por ejemplo, cisteína, lisina, etcétera) se ubica en una secuencia de bucle de un DBD (por ejemplo, Z_1 y Z_2 de las SEQ ID NOS: 7-11). En una modalidad, un residuo reactivo se ubica entre componentes de una fusión de DBDpp, por ejemplo, en un conector ubicado entre un DBDpp y otro componente de una proteína de fusión de DBDpp. El residuo reactivo (por ejemplo, cisteína, lisina, etcétera) también se puede ubicar dentro de la secuencia de un DBDpp, u otro componente de la proteína de fusión de DBDpp. En una modalidad, un DBDpp o una proteína de fusión de DBDpp comprende por

lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres residuos reactivos. En una modalidad, un DBDpp tal como una proteína de fusión de DBDpp comprende por lo menos uno, por lo menos dos, o por lo menos tres, residuos de cisteína.

Producción de DBDpp

La producción del DBDpp, útil en la práctica de los métodos proporcionados, se puede llevar a cabo utilizando una variedad de técnicas estándar para la síntesis química, métodos semi-sintéticos y metodologías de ADN recombinante conocidas en el campo. También se proporciona un método para producir un DBDpp, individualmente o como parte de una proteína de fusión de múltiples dominios, como agentes solubles y proteínas asociadas con células.

En varias modalidades, el esquema de producción total para DBDpp comprende obtener un andamiaje de proteína de referencia e identificar una pluralidad de residuos dentro del andamiaje para la modificación. Dependiendo de la modalidad, el andamiaje de referencia puede comprender una estructura de proteína con una o más regiones hélicas alfa, u otra estructura terciaria. Una vez identificados, la pluralidad de residuos se puede modificar, por ejemplo por medio de la sustitución de un aminoácido. En algunas modalidades la sustitución es conservadora, mientras que en otras modalidades se hacen sustituciones no conservadoras. En algunas modalidades un aminoácido natural (por ejemplo, uno de alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina) es sustituido en el andamiaje de referencia en la posición fijada como objetivo para la modificación. En ciertas modalidades, las modificaciones no incluyen la sustitución en ya sea una cisteína o una prolina. Después de que se han hecho modificaciones en todas las posiciones identificadas que se desean en una modalidad particular, los polipéptidos modificados resultantes (por ejemplo, el DBDpp candidato) se pueden expresar de manera recombinante, por ejemplo en un plásmido, bacteria, fago u otro vector (por ejemplo para incrementar el número de cada uno de los polipéptidos modificados). Los polipéptidos modificados entonces pueden ser purificados y examinados para identificar aquellos polipéptidos modificados que tienen la unión específica a un objetivo de interés particular. En varias modalidades, ciertos polipéptidos modificados mostrarán especificidad de unión mejorada por un objetivo de interés con respecto al andamiaje de referencia, el cual en algunas modalidades puede exhibir poca unión o puede no exhibir unión a un objetivo de interés determinado. En modalidades adicionales, dependiendo del objetivo de interés el andamiaje de referencia puede mostrar alguna interacción (por ejemplo interacción no específica) con un objetivo de interés, mientras que ciertos polipéptidos modificados exhibirán una especificidad de unión por lo menos aproximadamente dos veces, por lo menos aproximadamente cinco veces, por lo menos aproximadamente 10 veces, por lo menos aproximadamente 20 veces, por lo menos aproximadamente 50 veces o por lo menos aproximadamente 100 veces (o más) incrementada por el objetivo de interés. Opcionalmente, la secuencia de referencia y/o los polipéptidos modificados (por ejemplo, DBDpp) pueden ser desinmunizados. Por ejemplo, los residuos o motivos que son potencialmente inmunógenos se pueden identificar y modificar con el propósito de reducir o eliminar las respuestas inmunes potenciales al DBDpp. Los detalles adicionales con respecto a varias modalidades de la producción, selección y aislamiento de DBDpp se proporcionan con mayor detalle a continuación.

Expresión Recombinante de DBDpp

En algunas modalidades, un DBDpp tal como una proteína de fusión de DBDpp se "produce de manera recombinante" (es decir, se produce utilizando la tecnología de ADN recombinante). Los métodos recombinantes ejemplares que están disponibles para sintetizar proteínas de fusión de DBDpp, incluyen pero no están limitados a la síntesis basada en la reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), concatemerización, clonación sin discontinuidad y ligadura direccional recursiva (RDL, por sus siglas en inglés) (véase, por ejemplo, Meyer y colaboradores, *Biomacromolecules* 3:357-367 (2002), Kurihara y colaboradores, *Biotechnol. Lett.* 27:665-670 (2005), Haider y colaboradores, *Mol. Pharm.* 2:139-150 (2005); y McMillan y colaboradores, 32:3643-3646 (1999), los contenidos de cada uno de los cuales se incorpora en este documento a manera de referencia en su totalidad).

También se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica un DBDpp. Estos polinucleótidos comprenden opcionalmente además, uno o más elementos de control de expresión. Por ejemplo, el polinucleótido puede comprender uno o más promotores o intensificadores transcripcionales, sitios de unión ribosómicos, señales de terminación de transcripción, y señales de poliadenilación, como elementos de control de expresión. El polinucleótido se puede insertar dentro de cualquier vector adecuado, el cual puede estar contenido dentro de cualquier célula hospedante adecuada para la expresión.

La expresión de ácidos nucleicos que codifican el DBDpp se logra típicamente al vincular de manera operable un ácido nucleico que codifica el DBDpp a un promotor en un vector de expresión. Los vectores de expresión típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos deseada. Los métodos conocidos en el campo se pueden utilizar para construir de manera rutinaria vectores de expresión que contienen la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un DBDpp junto con señales de control de transcripción/traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación in vivo/recombinación genética. La expresión del polinucleótido se puede realizar en cualquier hospedante de expresión adecuado que sea conocido en el campo que incluye, pero no está limitado a células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células de plantas o células de mamíferos. En una modalidad, una secuencia de ácido nucleico que codifica un DBDpp se

vincula de manera operable a una secuencia promotora adecuada de tal manera que la secuencia de ácidos nucleicos sea transcrita y/o traducida en un DBDpp en un hospedante. Los promotores útiles para la expresión en *E. coli* incluyen pero no están limitados al promotor T7.

En una modalidad, un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un DBDpp se introduce en una célula hospedante (por ejemplo, fagémido) para la expresión de un DBDpp. El vector puede permanecer episomático o puede integrarse cromosómicamente, siempre y cuando el inserto que codifica el agente terapéutico pueda ser transcrito. Los vectores pueden ser contruidos por medio de una tecnología de ADN recombinante estándar. Los vectores pueden ser plásmidos, fagos, cósmidos, fagémidos, virus o cualquier otro tipo conocido en el campo, los cuales se utilizan para la replicación y expresión en células procarióticas o eucarióticas. Una persona experta en el campo apreciará que una amplia variedad de componentes conocidos en el campo (tales como elementos de control de expresión) se pueden incluir en estos vectores, que incluyen una amplia variedad de señales de transcripción, tales como promotores y otras secuencias que regulan la unión de la ARN polimerasa en el promotor. Cualquier promotor conocido o que demostró ser efectivo en las células en las cuales se expresará el vector se puede utilizar para iniciar la expresión del DBDpp. Los promotores adecuados pueden ser inducibles (por ejemplo, regulados) o constitutivos. Los ejemplos no limitantes de promotores adecuados incluyen la región del promotor temprano SV40, el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus de sarcoma de Rous, el promotor de timidina cinasa del HSV-1 (virus de herpes simple-1), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína, etcétera, así como también las siguientes regiones de control de transcripción de animales, las cuales exhiben especificidad por tejidos y han sido utilizadas en animales transgénicos: región de control del gen de elastasa I la cual es activa en células acinares pancreáticas; región de control del gen de insulina la cual es activa en células beta pancreáticas, región de control del virus de tumor de mama de ratón la cual es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos, región de control del gen de albúmina la cual es activa en el hígado, región de control del gen de alfa-fetoproteína la cual es activa en el hígado, región de control del gen de alfa 1-antitripsina la cual es activa en el hígado, región de control del gen de beta-globina la cual es activa en células eritroides, región de control del gen de proteína básica de mielina la cual es activa en células oligodendrocitos en el cerebro, región de control del gen de cadena-2 ligera de miosina la cual es activa en el músculo esquelético y región de control del gen de hormona de liberación de gonadotropina la cual es activa en el hipotálamo. En una modalidad particular, el promotor es una región de control del gen de inmunoglobulina la cual es activa en células linfoides.

En una modalidad, uno o varios ácidos nucleicos que codifican un DBDpp se expresan bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente, un sistema de expresión regulado. Los sistemas de expresión regulados adecuados incluyen, pero no están limitados a, un sistema de expresión regulado por tetraciclina, un sistema de expresión inducible por ecdisona, un sistema de expresión de conmutador lac, un sistema de expresión inducible por glucocorticoides, un sistema promotor inducible por la temperatura y un sistema de expresión inducible por metal metalotioneína. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican un DBDpp están contenidos dentro del sistema de células hospedantes, algunos de los ácidos nucleicos pueden ser expresados bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros pueden ser expresados bajo el control de un promotor regulado. Los niveles de expresión se pueden determinar por medio de métodos conocidos en el campo, que incluyen el análisis de inmunotransferencia Western y el análisis de inmunotransferencia Northern.

Una variedad de sistemas de hospedante-vector de expresión se puede utilizar para expresar un ácido nucleico que codifica un DBDpp. Los vectores que contienen los ácidos nucleicos que codifican el DBDpp (por ejemplo, subunidades individuales de DBD o fusiones de DBDpp) o porciones o fragmentos de los mismos, incluyen vectores plasmídicos, vectores de fagos de cadena individual y de doble cadena, así como también vectores virales de ARN o ADN de cadena individual y doble cadena. Los vectores de fagos y virales también se pueden introducir en células hospedantes en forma de virus empacados o encapsulados utilizando técnicas conocidas para la infección y transducción. Por otra parte, los vectores virales pueden ser competentes para la replicación o alternativamente, deficientes para la replicación. Alternativamente, los sistemas de traducción libres de células también se pueden utilizar para producir la proteína utilizando ARNs derivados de las construcciones de expresión de ADN (véase, por ejemplo, los documentos WO86/05807 y WO89/01036; y la Patente de los Estados Unidos No. 5.122.464, cada uno incorporado en su totalidad a manera de referencia en este documento).

Generalmente, cualquier tipo de células o línea de células cultivada se puede utilizar para expresar un DBDpp proporcionado en este documento. En algunas modalidades la línea de células de fondo utilizada para generar células hospedantes diseñadas es un fago, una célula bacteriana, una célula de levadura o una célula de mamífero. Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión en hospedantes para expresar la secuencia de codificación de una proteína de fusión de DBDpp. Las células de mamífero se pueden utilizar como sistemas de células hospedantes transfectados con vectores de expresión de ADN plasmídico o ADN cosmídico recombinantes que contienen la secuencia de codificación del objetivo de interés y la secuencia de codificación del polipéptido de fusión.

Las células pueden ser aislados primarios de organismos (que incluyen humanos), cultivos o líneas de células de naturaleza transformada o transgénica. En algunas modalidades la célula hospedante es una célula de humano. En algunas modalidades, la célula hospedante es una célula T de humano. En algunas modalidades, la célula hospedante se deriva de un paciente humano.

Las células hospedantes útiles incluyen pero no están limitadas a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófagos, ADN plasmídico o ADN cosmídico recombinantes que contienen secuencias de codificación de DBDpp; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias de codificación de DBDpp; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, *Baculovirus*) que contienen secuencias de codificación de DBDpp; sistemas de células de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias de codificación de DBDpp. En modalidades particulares, los sistemas de células de mamíferos se utilizan para producir el DBDpp. Los sistemas de células de mamíferos utilizan típicamente construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de virus de la vaccinia 7,5 K).

Los procariotas útiles como células hospedantes en la producción de un DBDpp tal como una proteína de fusión de DBDpp, incluyen organismos gram-negativos o gram-positivos tales como, *E. coli* y *B. subtilis*. Los vectores de expresión para el uso en células hospedantes procarióticas contienen generalmente uno o más genes marcadores seleccionables fenotípicos (por ejemplo, genes que codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos o que suministran un requerimiento autotrófico). Los ejemplos de vectores de expresión de hospedantes procarióticos útiles incluyen las series pKK223-3 (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pGEM1 (Promega, Wis., EUA), pET (Novagen, Wis., EUA) y pRSET (Invitrogen, California, EUA) de vectores (véase, por ejemplo, Studier, J. Mol. Biol. 219:37 (1991) y Schoepfer, Gene 124:83 (1993)). Las secuencias promotoras ejemplares utilizadas frecuentemente en vectores de expresión de células hospedantes procarióticas incluyen T7, (Rosenberg y colaboradores, Gene 56:125-135 (1987)), beta-lactamasa (penicilinas), sistema promotor de lactosa (Chang y colaboradores, Nature 275:615 (1978)); y Goeddel y colaboradores, Nature 281:544 (1979)), sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel y colaboradores, Nucl. Acids Res. 8:4057, (1980)) y promotor de *tac* (Sambrook y colaboradores, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

En una modalidad, se deben utilizar sistemas de células hospedantes eucarióticas que incluyen células de levadura transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia de codificación de un DBDpp, tales como los sistemas de expresión enseñados en la Solicitud de los Estados Unidos No. 60/344,169 y el documento WO03/056914 (methods for producing humanlike glycoprotein in a non-human eukaryotic host cell) (los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan a manera de referencia en su totalidad). La levadura ejemplar que se puede utilizar para producir composiciones de la invención, tal como DBD, incluye levadura del género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces* y *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura contienen típicamente un origen de secuencia de replicación de un plásmido de levadura 2mu, una secuencia de replicación de manera autónoma (ARS, por sus siglas en inglés), una región promotora, secuencias para la poliadenilación, secuencias para la terminación de transcripción y un gen marcador seleccionable. Los ejemplos de secuencias promotoras en construcciones de expresión de levadura incluyen, promotores de metalotioneína, 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman, J. Biol. Chem. 255:2073 (1980)) y otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfo glicerato mutasa, piruvato cinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa. Los vectores y promotores adecuados adicionales para el uso en la expresión de levadura así como también protocolos de transformación de levadura son conocidos en el campo. Véase, por ejemplo, Fleer, Gene 107:285-195 (1991) y Hinnen, PNAS 75:1929 (1978).

Los sistemas de cultivo de células hospedantes de insectos y plantas también son útiles para producir las composiciones de la invención. Estos sistemas de células hospedantes incluyen por ejemplo sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, *baculovirus*) que contienen la secuencia de codificación de un DBD; sistemas de células de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen la secuencia de codificación de un DBD, que incluyen, pero no están limitados a, los sistemas de expresión enseñados en la patente de los Estados Unidos. No. 6.815.184; Publicaciones de los Estados Unidos Nos. 60/365.769 y 60/368.047; y documentos WO2004/057002, WO2004/024927 y WO2003/078614, los contenidos de cada uno de los cuales se incorpora en este documento a manera de referencia en su totalidad.

En una modalidad adicional se pueden utilizar los sistemas de células hospedantes que incluyen sistemas de células de animales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, adenovirus, retrovirus, virus adeno-asociados, virus del herpes, lentivirus) que incluyen líneas de células diseñadas para contener múltiples copias del ADN que codifica un DBDpp ya sea amplificado de manera estable (CHO/dhfr) o amplificado de manera no estable en cromosomas diminutos dobles (por ejemplo, líneas de células de murino). En una modalidad, el vector que comprende el(los) polinucleótido(s) que codifica el DBDpp es policistrónico. Las células de mamífero ejemplares que son útiles para la producir estas composiciones incluyen células 293 (por ejemplo, 293T y 293F), células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 (Crucell, Los Países Bajos) células VERY, células HeLa, células COS, células MDCK, células 3T3, células

W138, células BT483, células Hs578T, células HTB2, células BT20, células T47D, células CRL7030, células HsS78Bst, células de hibridoma y otras células de mamífero. Las células hospedantes de mamífero ejemplares adicionales que son útiles en la práctica de la invención incluyen pero no están limitadas a células T. Algunos ejemplos de sistemas de expresión y métodos de selección se describen en las siguientes referencias y las referencias citadas en las mismas: Borth y colaboradores, *Biotechnol. Bioen.* 71(4):266-73 (2000), en Werner y colaboradores, *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48(8):870-80 (1998), Andersen y colaboradores, *Curr. Op. Biotechnol.* 13:117-123 (2002), Chadd y colaboradores, *Curr. Op. Biotechnol.* 12:188-194 (2001) y Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12:450-454 (2001). Los ejemplos adicionales de sistemas de expresión y métodos de selección se describen en Logan y colaboradores, *PNAS* 81:355-359 (1984), Birtner y colaboradores *Methods Enzymol.* 153:51-544 (1987)). Las secuencias de control de transcripción y traducción para vectores de expresión de células hospedantes de mamífero se derivan frecuentemente de genomas virales. Las secuencias de promotores y secuencias de intensificadores utilizadas comúnmente en vectores de expresión de mamíferos incluyen secuencias derivadas de virus Polioma, Adenovirus 2, Virus de Simio 40 (SV40) y citomegalovirus de humano (CMV). Los vectores de expresión comercialmente disponibles ejemplares para el uso en células hospedantes de mamífero incluyen pCEP4 (Invitrogen) y pcDNA3 (Invitrogen).

Los métodos físicos para introducir un ácido nucleico en una célula hospedante (por ejemplo, una célula hospedante de mamífero) incluyen la precipitación de fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en el campo. Véase, por ejemplo, Sambrook y colaboradores (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York).

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula hospedante incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han vuelto el método utilizado más ampliamente para insertar genes en células de mamífero (por ejemplo, de humano). Otros vectores virales se pueden derivar de lentivirus, virus de viruela, virus de herpes simple I, adenovirus y virus adeno-asociados y similares. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.350.674 y 5.585.362, los contenidos de cada una de las cuales se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad.

Los métodos para introducir polinucleótidos de ADN y ARN de interés en una célula hospedante incluyen la electroporación de células, en la cual se aplica un campo eléctrico a células con el propósito de incrementar la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo que productos químicos, fármacos o polinucleótidos sean introducidos en la célula. Las construcciones de ADN o ARN que contienen DBDpp se pueden introducir en células de mamífero o procarióticas utilizando la electroporación.

En una modalidad preferida, la electroporación de células da por resultado la expresión de un DBDpp-CAR sobre la superficie de células T, células NK, células NKT. Esta expresión puede ser transitoria o estable durante la vida de la célula. La electroporación se puede realizar con métodos conocidos en el campo que incluyen Sistemas de Transfección MaxCyte GT^{MR} y STX^{MR} (MaxCyte, Gaithersburg, MD, EUA).

Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedante incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, cuentas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mezcladas y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para el uso como un vehículo de suministro in vitro e in vivo es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial). En el caso donde se utiliza un sistema de suministro no viral, un vehículo de suministro ejemplar es un liposoma. El uso de formulaciones de lípidos se contempla para la introducción de ácidos nucleicos en una célula hospedante (in vitro, ex vivo o in vivo). En otro aspecto, el ácido nucleico se puede asociar con un lípido. El ácido nucleico asociado con un lípido puede ser encapsulado en el interior acuoso de un liposoma, entremezclado dentro de la bicapa de lípido de un liposoma, adherido a un liposoma a través de una molécula de vinculación que está asociada tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, atrapado en un liposoma, formado en complejo con un liposoma, dispersado en una solución que contiene un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un lípido, contenido como una suspensión en un lípido, contenido o formado en complejo con una micela, o asociado de otra manera con un lípido. Las composiciones asociadas con lípidos, lípidos/ADN o lípidos/vectores de expresión no están limitadas a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura de bicapa, como micelas o con una estructura "colapsada". También pueden ser entremezcladas simplemente en una solución, formando posiblemente agregados que no tienen tamaño o forma uniforme. Los lípidos son sustancias grasosas las cuales pueden ser lípidos de origen natural o sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotitas de grasa que aparecen naturalmente en el citoplasma así como también la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tales como ácidos grasos, alcoholes, aminas, amino-alcoholes y aldehídos.

Los lípidos adecuados para el uso se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, la dimiristoil-fosfatidilcolina ("DMPC") se puede obtener de Sigma, St. Louis, MO; el fosfato de dicetilo ("DCP") se puede obtener de K & K Laboratorios (Plainview, NY); el colesterol ("Choi") se puede obtener de Calbiochem-Behring; el dimiristoil-fosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a aproximadamente -20°C. El cloroformo se puede utilizar como el único solvente puesto que se evapora más fácilmente que el metanol. "Liposoma"

es un término genérico que comprende una variedad de vehículos de lípidos individuales y multilaminares formadas por medio de la generación de bicapas o agregados de lípidos encerrados. Los liposomas se pueden caracterizar como que tienen estructuras vesiculares con una membrana de bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interior. Los liposomas multilaminares tienen múltiples capas de lípidos separadas por un medio acuoso. Éstos se forman espontáneamente cuando fosfolípidos son suspendidos en un exceso de solución acuosa. Los componentes de lípidos se someten a un autorreordenamiento antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas de lípidos (Ghosh y colaboradores, *Glycobiology* 5:505-510 (1991)). Sin embargo, las composiciones que tienen diferentes estructuras en solución que la estructura vesicular normal también están comprendidas. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o pueden existir solamente como agregados no uniformes de moléculas de lípidos. También se contemplan complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedante, o la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos recombinantes en la célula hospedante se puede confirmar de manera rutinaria a través de una variedad de ensayos conocidos en el campo. Estos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares" conocidos en el campo, tales como inmunotransferencias Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tal como la detección de la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ensayos ELISA e inmunotransferencias Western) o por medio de ensayos descritos en este documento para identificar agentes que se encuentran dentro del alcance de la invención.

Los genes reporteros se utilizan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de secuencias reguladoras. En general, un gen reportero es un gen que no está presente en o es expresado por el organismo, tejido o célula receptor y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, actividad enzimática. La expresión del gen reportero se somete a ensayo en un tiempo adecuado después de que el ADN ha sido introducido en las células receptoras. Una lista no limitante de genes reporteros adecuados puede incluir genes que codifican luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada o el gen de proteína fluorescente verde (por ejemplo, Ui-Tei y colaboradores, *FEBS Lett* 479:79-82 (2000)). Los sistemas de expresión adecuados son conocidos en el campo y se pueden preparar utilizando técnicas conocidas o se pueden obtener comercialmente. En general, la construcción con la región blanqueadora 5' mínima que muestra el nivel más alto de expresión de gen reportero se identifica como el promotor. Estas regiones promotoras pueden ser vinculadas rutinariamente con un gen reportero y se pueden utilizar para evaluar agentes por la capacidad para modular la transcripción impulsada por promotores.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de selección en sistemas de expresión de vectores de hospedantes mamíferos, que incluyen, pero no están limitados a, los genes de timidina cinasa, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa del virus de herpes simple (Lowy y colaboradores, *Cell* 22:817 (1980)), los cuales se pueden emplear en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Adicionalmente, la resistencia a antimetabolitos se puede utilizar como la base de selección para por ejemplo, dhfr, gpt, neo, hygro, trpB, hisD, ODC (ornitina descarboxilasa) y el sistema de glutamina sintasa.

Purificación de DBDpp

Una vez que un DBDpp tal como una proteína de fusión de DBDpp ha sido producida por medio de la expresión recombinante, se puede purificar por cualquier método conocido en el campo para la purificación de una proteína recombinante, por ejemplo, por medio de la cromatografía (por ejemplo, cromatografía en columna de intercambio de iones, afinidad y dimensionamiento), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. En modalidades adicionales, el DBDpp se fusiona opcionalmente a secuencias de polipéptidos heterólogas descritas en este documento o conocidas de otra manera en el campo para facilitar la purificación. Más particularmente, se contempla que ligandos (por ejemplo, anticuerpos y otras matrices de afinidad) para columnas de afinidad por DBDpp para la purificación por afinidad y que opcionalmente, el DBDpp u otros componentes de la composición de fusión de DBDpp que son unidos por esos ligandos son retirados de la composición antes de la preparación final del DBDpp utilizando técnicas conocidas en el campo.

Expresión de DBDpp Asociado con Células

En otra modalidad de la invención, la producción del DBDpp da por resultado composiciones de DBDpp asociadas con células. Por ejemplo, la expresión de vectores recombinantes que codifican el DBDpp vinculado de manera operable a un ancla de la membrana celular o dominio transmembrana tienen el potencial de permanecer asociados con las células. Los receptores de antígenos químicos que comprenden DBDpp están asociados intencionalmente con células y se utilizan en el contexto de la célula en la cual se expresan. Una modalidad particular se refiere a una estrategia de transferencia adoptiva de células de las células T las cuales han sido transducidas para expresar un receptor de antígeno químico de DBDpp (CAR). Preferiblemente, la célula puede ser modificada genéticamente para expresar de manera estable un DBDpp sobre su superficie, confiriendo una especificidad novedosa por objetivos que es independiente de MHC.

Se puede utilizar una variedad de vectores derivados de virus en aplicaciones en las cuales los virus se utilizan para la transfección e integración en un genoma de células de mamífero. Los virus, los cuales son útiles como vectores

incluyen, pero no están limitados a, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus de herpes y lentivirus. Los vectores lentivirales son particularmente adecuados para lograr la transferencia de genes a largo plazo (por ejemplo, terapia inmune adoptiva de células T), puesto que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivirales tienen la ventaja agregada sobre vectores derivados de onco-retrovirus tales como virus de leucemia de murino de que pueden transducir células no proliferantes, tales como hepatocitos. También tienen la ventaja agregada de inmunogenicidad baja. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en por lo menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasa de restricción convenientes y uno o más marcadores seleccionables, (por ejemplo, documentos WO 01/96584 y WO 01/29058; y Patente de los Estados Unidos No. 6.326.193). Varias secuencias promotoras de vectores están disponibles para la expresión de los transgenes. Un ejemplo de un promotor adecuado es la secuencia del promotor de citomegalovirus temprano inmediato (CMV). Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte que tiene la capacidad de impulsar altos niveles de expresión de cualquier secuencia de polinucleótidos vinculada de manera operable a la misma. Otro ejemplo de un promotor adecuado es EF-1a. Sin embargo, también se pueden utilizar otras secuencias promotoras constitutivas que incluyen, pero no están limitadas a el promotor temprano del virus de simio 40 (SV40), virus de tumor mamario de ratón (MMTV), promotor de repetición terminal larga (LTR) de virus de inmunodeficiencia humana (HIV), promotor de MoMuLV, un promotor de virus de leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus Epstein-Barr, un promotor del virus de sarcoma de Rous, así como también promotores de genes humanos tales como, pero no limitados a, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina cinasa. Los promotores inducibles incluyen, pero no están limitados a un promotor de metalotioneína, un promotor de glucocorticoide, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

Con el propósito de evaluar la expresión de un polipéptido de DBDpp-CAR o porciones del mismo, el vector de expresión que se introduce en una célula también puede contener ya sea un gen marcador seleccionable o un gen reportero o ambos para facilitar la identificación y selección de células de expresión de la población de células las cuales se busca transfectar o infectar a través de vectores virales, en otros aspectos, el marcador seleccionable puede ser llevado en una pieza separada de ADN y se puede utilizar en un procedimiento de co-transfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes reporteros pueden ser flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para hacer posible la expresión en las células hospedantes. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tal como neo y similares.

Antes de la expansión y la modificación genética de las células T de la invención, una fuente de células T se obtiene de un sujeto. Las células T se pueden obtener de una variedad de fuentes, que incluyen células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de nódulos linfáticos, sangre de cordón, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido de bazo y tumores. En ciertas modalidades proporcionadas en este documento, se puede utilizar cualquier variedad de líneas de células T disponibles en el campo.

Un planteamiento completo de métodos de aislamiento, cultivo, activación y expansión de células T se puede encontrar en el documento WO 2012079000, los contenidos del cual se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad.

Se proporciona adicionalmente una célula hospedante que comprende ácidos nucleicos que codifican un DBDpp descrito en este documento. Se proporciona además una composición que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el DBDpp.

"Co-expresar" como se utiliza en este documento se refiere a la expresión simultánea de dos o más secuencias de codificación de proteínas. Las secuencias de codificación pueden ser ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, una proteína individual o una proteína quimérica como una cadena de polipéptido individual.

Síntesis Química de DBDpp

Además de métodos recombinantes, la producción de DBDpp también se puede llevar a cabo utilizando la síntesis química orgánica del polipéptido deseado utilizando una variedad de procesos químicos en fase líquida y sólida que son conocidos en el campo. Varios sintetizadores automáticos están disponibles comercialmente y se pueden utilizar de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Tam y colaboradores, J. Am. Chem. Soc., 105:6442 (1983); Merrifield, Science 232:341-347 (1986); Barany y Merrifield, The Peptides, Gross and Meienhofer, eds, Academic Press, Nueva York, 1-284; Barany y colaboradores, Int. J. Pep. Protein Res., 30:705 739 (1987); Kelley y colaboradores en Genetic Engineering Principles and Methods, Setlow, J.K., ed. Plenum Press, NY. 1990, vol. 12, páginas 1-19; Stewart y colaboradores, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, 1989. Una ventaja de esas metodologías es que permiten la incorporación de residuos de aminoácidos no naturales en la secuencia del DBDpp.

El DBDpp que se puede utilizar en los métodos de la presente invención se puede modificar durante o después de la síntesis o traducción, por ejemplo, por medio de la glicosilación, acetilación, bencilación, fosforilación, amidación, conjugación con PEG, formilación, derivatización por medio de grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, vinculación a una molécula de anticuerpo, hidroxilación, yoduración, metilación, miristoilación, oxidación,

conjugación con PEG, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, ubiquitinación, etcétera (Véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2ª Ed. (W.H. Freeman and Co., N.Y., 1992); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, Johnson, ed. (Academic Press, Nueva York, 1983), páginas 1-12; Seifter, *Meth. Enzymol.*, 182:626-646 (1990); Rattan, *Ann. NY Acad. Sci.*, 663:48-62 (1992)). En modalidades específicas, los péptidos son acetilados en la terminal N y/o amidados en la terminal C.

Cualquiera de numerosas modificaciones químicas se pueden llevar a cabo por medio de técnicas conocidas, que incluyen, pero no están limitadas a acetilación, formilación, etcétera. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Las poblaciones de DBDpp Pueden ser Representadas por Colecciones de Polipéptidos

Una "colección" de DBDpp se refiere a una pluralidad de DBDpp únicos. Una "colección de vectores" de DBDpp se refiere a una pluralidad de ácidos nucleicos únicos que codifican los DBDpp. Estas colecciones de DBDpp se pueden utilizar para seleccionar e identificar secuencias que promueven la unión a objetivos predeterminados específicos.

En un ejemplo, los DBDpp son representados por una población mezclada, o colección, de diferentes moléculas de DBDpp. Una colección de DBDpp no implica ninguna limitación de tamaño particular a la variedad de moléculas de polipéptidos únicas. Una colección puede contener tan solo 3, 5, 6, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 o 100 DBDpp únicos, y puede variar a más de 1020 DBDpp diferentes. En algunos ejemplos la colección tiene hasta aproximadamente 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 o 10^8 DBDpp únicos. En ejemplos adicionales la colección tiene hasta aproximadamente 10^{12} DBDpp diferentes.

En un ejemplo, una población de variantes de polipéptidos se basa en una secuencia de residuos de núcleo y residuos variantes. Por ejemplo, los residuos variantes de la SEQ ID NO:3 son indicados por una X, donde X puede ser cualquier residuo de aminoácido independiente de la identidad de algún otro residuo indicado por X en la secuencia. En ciertos ejemplos, X puede comprender una posición nula (por ejemplo, sin aminoácido en ese sitio). En la secuencia de aminoácidos del andamiaje los diferentes aminoácidos variados X se pueden seleccionar de los 20 residuos de aminoácidos de origen natural de tal manera que cualquiera de estos 20 residuos de aminoácidos de origen natural pueden estar presentes en la posición X correspondiente en cualquier variante determinada. La selección de un residuo de aminoácido en cada posición es más o menos aleatorizada, dependiendo del ejemplo. También es posible limitar el grupo del cual se seleccionan los diferentes residuos de aminoácidos variados a 19, 18, 17, 16 o menos de los 20 residuos de aminoácidos de origen natural. Por ejemplo, algunos ejemplos modalidades, los residuos variantes no son reemplazados por cisteína y/o prolina. La variabilidad en diferentes posiciones se puede ajustar individualmente, entre uno, lo que significa sin aleatorización, hasta los 20 aminoácidos. La introducción aleatoria de un subconjunto más pequeño de aminoácidos se puede obtener por medio de la selección cuidadosa de las bases de desoxirribonucleótidos introducidas, por ejemplo los codones T (A/C) C se pueden introducir para obtener una introducción aleatoria de ya sea serina o tirosina en una posición determinada en la cadena de polipéptido. Del mismo modo, los codones (T/C/A/G) CC se pueden introducir para obtener una introducción aleatoria de fenilalanina, leucina, alanina y valina en una posición determinada en la cadena de polipéptido. Como sería entendido por una persona de experiencia ordinaria en el campo se pueden utilizar muchas alternativas de combinaciones de bases de desoxirribonucleótidos para obtener diferentes combinaciones de aminoácidos en una posición determinada en la cadena de polipéptido. El conjunto de aminoácidos que pueden aparecer en una posición determinada en la cadena de polipéptido también se puede determinar por medio de la introducción de trinucleótidos durante la síntesis de oligonucleótidos, en lugar de una base de desoxirribonucleótido a la vez.

También se describe una colección que contiene una pluralidad de DBDpp. En algunos ejemplos, la colección de DBDpp comprende una pluralidad de diferentes DBDpp que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 en donde de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 residuos de aminoácidos han sido modificados; y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En algunos ejemplos, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 de los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones. En algunos ejemplos, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45 o de 5 a 50 de los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones conservadoras. En algunos ejemplos, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45 o de 5 a 50 de los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones no conservadoras. En un ejemplo adicional, de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos son sustituciones conservadoras y de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos son sustituciones no conservadoras. En ejemplos adicionales, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 de las sustituciones son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de: M1, G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, L21, G22, G23, S24, E25, A26, E27, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, Y45, K46, G47, K48, G49, N50, P51, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69, Y70, R71, H72 y N73. En un ejemplo adicional, de 1 a 20, de 1 a 30 o de 1 a 40 de las sustituciones son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, seleccionados del grupo que consiste de: G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69 e Y70. En otro ejemplo, la colección comprende por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000

diferentes DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos. En un ejemplo adicional, los diferentes objetivos unidos por los DBDpp en la colección se seleccionan del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, la colección comprende por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo de proteína seleccionado del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de secuencia. En un ejemplo adicional, la colección comprende por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, la colección es una colección de vectores o una colección de células hospedantes. En un ejemplo adicional, la colección de vectores es una colección de células hospedantes. En otro ejemplo, la colección de células hospedantes comprende una pluralidad de células hospedantes que exhiben el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, las células hospedantes son fagos que exhiben el DBDpp sobre su superficie.

En algunos ejemplos, la colección de DBDpp comprende: (a) 3 DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos; (b) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo objetivo; (c) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo epítipo de un objetivo de interés; (d) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente a diferentes epítopos de un objetivo; o (e) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que compiten por la unión al mismo objetivo.

También se describe una colección que contiene una pluralidad de DBDpp. En algunos ejemplos, la colección de DBDpp comprende una pluralidad de diferentes DBDpp que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 en donde de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 residuos de aminoácidos han sido modificados; y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En algunos ejemplos, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 de los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones. En algunos ejemplos, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45 o de 5 a 50 de los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones conservadoras. En algunos ejemplos, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45 o de 5 a 50 de los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones no conservadoras. En un ejemplo adicional, de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos son sustituciones conservadoras y de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos son sustituciones no conservadoras. En ejemplos adicionales, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 de las sustituciones son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de: M1, G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, L21, G22, G23, S24, E25, A26, E27, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, Y45, K46, G47, K48, G49, N50, P51, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69, Y70, R71, H72 y N73. En un ejemplo adicional, de 1 a 20, de 1 a 30 o de 1 a 40 de las sustituciones son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de: G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69 e Y70. En otro ejemplo, la colección comprende por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos. En un ejemplo adicional, los diferentes objetivos unidos por DBDpp en la colección se seleccionan del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, la colección comprende por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo de proteína seleccionado del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, la colección comprende por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, la colección es una colección de vectores o una colección de células hospedantes [que incluye partículas virales]. En un ejemplo adicional, la colección de vectores es una colección de células hospedantes. En otro ejemplo, la colección de células hospedantes comprende una pluralidad de células hospedantes que exhiben el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, las células hospedantes son fagos que exhiben el DBDpp sobre su superficie.

En algunos ejemplos, la colección de DBDpp comprende: (a) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos; (b) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo objetivo; (c) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo epítipo de un objetivo de interés; (d) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente a diferentes epítopos de un objetivo; o (e) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que compiten por la unión al mismo objetivo.

En un ejemplo adicional, la colección de DBDpp contiene una pluralidad de diferentes secuencias de ácidos nucleicos que codifican el DBDpp, que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 en donde un total de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 residuos de aminoácidos han sido

modificados; y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En otro ejemplo, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 de los residuos de aminoácidos modificados que son codificados por las secuencias de ácidos nucleicos son sustituciones. En otro ejemplo, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45 o de 5 a 50 de los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones conservadoras. En otro ejemplo, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45 o de 5 a 50 de los residuos de aminoácidos modificados codificados son sustituciones no conservadoras. En un ejemplo adicional, de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos codificados son sustituciones conservadoras y de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos codificadas son sustituciones no conservadoras. En ejemplos adicionales, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 de las sustituciones codificadas son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de: M1, G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, L21, G22, G23, S24, E25, A26, E27, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, Y45, K46, G47, K48, G49, N50, P51, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69, Y70, R71, H72 y N73. En un ejemplo adicional, de 1 a 20, de 1 a 30 o de 1 a 40 de las sustituciones codificadas son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, seleccionados del grupo que consiste de: G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69 e Y70. En un ejemplo adicional, los ácidos nucleicos codifican opcionalmente un DBDpp que comprende además una secuencia de aminoácidos en donde de 1 a 5, de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de los residuos que corresponden a los residuos inaccesibles para solventes de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En otro ejemplo, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos. En un ejemplo adicional, los diferentes objetivos unidos por los DBDpp en la colección se seleccionan del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifica por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo de proteína seleccionado del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, la colección de vectores está contenida en células hospedantes (por ejemplo, partículas virales). En otro ejemplo, la colección comprende una pluralidad de células hospedantes que exhiben el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, las células hospedantes son fagos que exhiben el DBDpp sobre su superficie. En algunos ejemplos, la colección de DBDpp comprende: (a) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos; (b) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo objetivo; (c) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo epítipo de un objetivo; (d) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente a diferentes epítopos de un objetivo; o (e) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que compiten por la unión al mismo objetivo.

También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican DBDpp tales como proteínas de fusión de DBDpp. En algunas modalidades la célula hospedante que contiene los ácidos nucleicos es una célula de bacteria, levadura, hongo o mamífero. En una modalidad adicional, la célula hospedante es una célula inmune. En una modalidad adicional, la célula hospedante es una célula inmune de humano. En una modalidad adicional, la célula inmune de humano expresa el DBDpp sobre su superficie celular. En modalidades particulares, el ácido nucleico codifica una proteína de fusión de DBDpp. En una modalidad adicional, la célula hospedante expresa el DBDpp como una proteína de fusión sobre la superficie celular. En este documento se proporcionan adicionalmente colecciones de vectores que comprenden una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican el DBDpp.

En un ejemplo, una colección de vectores comprende una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos que codifican el DBDpp, en donde el DBDpp codificado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

(a) MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAEALAAFEK EIAAFESELQAYKGKGNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₅₅, X₅₈, X₅₉, X₆₂, X₆₅ y X₆₆, son un residuo de aminoácido natural y/o no natural; (b) MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAEALAX₃₀FEX₃₃X₃₄IX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₃₀, X₃₃, X₃₄, X₃₇, X₄₀, X₄₁ y X₄₄ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural; (c) MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAEALAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3), en donde X₃₂, X₃₃, X₃₆, X₃₉, X₄₀, X₄₃, X₅₇, X₅₈, X₆₁, X₆₄, X₆₅ y X₆₈ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural y; (d) MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAEALAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₃₂, X₃₃, X₃₆, X₃₉, X₄₀, X₄₃, X₅₅, X₅₈, X₅₉, X₆₂, X₆₅ y X₆₆ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural; y (e) MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAEALAX₃₀FEX₃₃X₃₄IX₃₇FEX₄₀X₄₁LQX₄₄YKGKGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6), en donde X₅, X₈,

X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₃₀, X₃₃, X₃₄, X₃₇, X₄₀, X₄₁, X₄₄, X₅₇, X₅₈, X₆₁, X₆₄, X₆₅ y X₆₈ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural; y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. En un ejemplo adicional, una pluralidad de vectores en la colección codifican una proteína de fusión de DBDpp. En otro ejemplo, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos. En una modalidad adicional, los diferentes objetivos unidos por el DBDpp codificado por los ácidos nucleicos en la colección se seleccionan del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo de proteína seleccionado del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, una pluralidad de los vectores de la colección de vectores están contenidos en células hospedantes (por ejemplo, partículas virales tales como fagos), células de *E. coli*, levadura y de mamífero. En otro ejemplo, las células hospedantes exhiben el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, las células hospedantes son fagos que exhiben el DBDpp sobre su superficie. En algunas modalidades, la colección de vectores comprende: (a) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos; (b) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más del 10 DBDpp, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo objetivo; (c) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo epítipo de un objetivo; (d) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente a diferentes epítopos de un objetivo; (e) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que compiten por la unión al mismo objetivo; o (f) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 diferentes ácidos nucleicos que codifican el mismo DBDpp. También se proporcionan células hospedantes que contienen los vectores.

En un ejemplo, una colección de vectores comprende una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican DBDpp que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de: (a) MGS WX₅EFX₈RLX₁₂IX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAAFEKEIAAFESSELQAYZ₂NPEVEX₅₀LR X₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:9), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₅₀, X₅₃, X₅₄, X₅₇, X₆₀ y X₆₁ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; (b) MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LA X₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPEVEALRKEAAA IRDELQAYRHN (SEQ ID NO: 7), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₂₈, X₃₁, X₃₂, X₃₅, X₃₈, X₃₉ y X₄₂ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; (c) MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAEL AAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:8), en donde X₃₀, X₃₁, X₃₄, X₃₇, X₃₈, X₄₁, X₅₂, X₅₃, X₅₆, X₅₉, X₆₀ y X₆₃ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; (d) MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₃₀, X₃₁, X₃₄, X₃₇, X₃₈, X₄₁, X₅₀, X₅₃, X₅₄, X₅₇, X₆₀ y X₆₁ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; y (e) MGSWX₅EFX₈RKX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPEVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₂₈, X₃₁, X₃₂, X₃₅, X₃₈, X₃₉, X₄₂, X₅₂, X₅₃, X₅₆, X₅₉, X₆₀ y X₆₃ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. En un ejemplo adicional, una pluralidad de vectores en la colección codifican una proteína de fusión de DBDpp. En otro ejemplo, la colección comprende ácidos nucleicos que codifica por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos. En un ejemplo adicional, los diferentes objetivos unidos por el DBDpp codificado por los ácidos nucleicos en la colección se seleccionan del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo de proteína seleccionado del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifica por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, la colección de los vectores de la colección de vectores están contenidos en células hospedantes. En otro ejemplo, las células hospedantes (por ejemplo, partículas virales) exhiben el DBDpp sobre su superficie. En una modalidad adicional, las células hospedantes son fagos que exhiben el DBDpp sobre su superficie. En algunos ejemplos, la colección de vectores comprende: (a) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que se unen específicamente a diferentes

objetivos; (b) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más del 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo objetivo; (c) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo epítipo de un objetivo; (d) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente a diferentes epítopos de un objetivo; (e) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que compiten por la unión al mismo objetivo; o (f) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 secuencias de ácidos nucleicos diferentes que codifican la misma secuencia de DBDpp. También se proporcionan células hospedantes que contienen los vectores.

En algunos ejemplos, 4, 5, 10 o más DBDpp codificados por los ácidos nucleicos en la colección se unen específicamente a diferentes objetivos.

En un ejemplo, una colección de vectores comprende una pluralidad de diferentes secuencias de ácidos nucleicos que codifican el DBDpp, que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 en donde un total de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 residuos de aminoácidos han sido modificados; y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En otro ejemplo, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 de los residuos de aminoácidos modificados que son codificados por las secuencias de ácidos nucleicos son sustituciones. En otro ejemplo, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45 o de 5 a 50 de los residuos de aminoácidos modificados son sustituciones conservadoras. En otro ejemplo, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45 o de 5 a 50 de los residuos de aminoácidos modificados codificados son sustituciones no conservadoras. En un ejemplo adicional, de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos codificadas son sustituciones conservadoras y de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de las modificaciones de residuos de aminoácidos codificadas son sustituciones no conservadoras. En ejemplos adicionales, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40, de 5 a 45, de 5 a 50, de 5 a 55 o de 5 a 60 de las sustituciones codificadas son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 seleccionados del grupo que consiste de: M1, G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, L21, G22, G23, S24, E25, A26, E27, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, Y45, K46, G47, K48, G49, N50, P51, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69, Y70, R71, H72 y N73. En un ejemplo adicional, de 1 a 20, de 1 a 30 o de 1 a 40 de las sustituciones codificadas son en residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, seleccionados del grupo que consiste de: G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69 e Y70. En un ejemplo adicional, los ácidos nucleicos codifican opcionalmente un DBDpp que comprende además una secuencia de aminoácidos en donde de 1 a 5, de 5 a 15, de 5 a 20, de 5 a 25, de 5 a 30, de 5 a 35, de 5 a 40 o de 5 a 45 de los residuos que corresponden a los residuos inaccesibles para solventes de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 son sustituidos y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En otro ejemplo, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos. En un ejemplo adicional, los diferentes objetivos unidos por el DBDpp en la colección se seleccionan del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo de proteína seleccionado del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, la colección de vectores está contenida en células hospedantes (por ejemplo, partículas virales). En otro ejemplo, la colección comprende una pluralidad de células hospedantes que exhiben el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, las células hospedantes son fagos que exhiben el DBDpp sobre su superficie. En algunos ejemplos, la colección de vectores comprende: (a) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos; (b) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo objetivo; (c) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo epítipo de un objetivo; (d) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente a diferentes epítopos de un objetivo; o (e) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que compiten por la unión al mismo objetivo; o (f) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 diferentes ácidos nucleicos que codifican el mismo DBDpp. También se proporcionan células hospedantes que contienen los vectores.

En algunos ejemplos, la colección de vectores comprende: (a) ácidos nucleicos que codifican 3 DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos de interés; (b) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo objetivo de interés; (c) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo epítipo de un objetivo de interés; (d) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente a diferentes epítopos de un objetivo de interés; (e) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias

que compiten por la unión al mismo objetivo de interés; o (f) 3 secuencias de ácidos nucleicos diferentes que codifican la misma secuencia de DBDpp.

En un ejemplo, la colección de vectores comprende una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican el DBDpp que comprenden un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de: (a) MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAAFEKEIAAFESELRQAYZ₂NPEVEX₅₀LRX₅₃X₅₄AA X₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:9), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₅₀, X₅₃, X₅₄, X₅₇, X₆₀ y X₆₁ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; (b) MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:7), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₂₈, X₃₁, X₃₂, X₃₅, X₃₈, X₃₉ y X₄₂ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; (c) MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:8), en donde X₃₀, X₃₁, X₃₄, X₃₇, X₃₈, X₄₁, X₅₂, X₅₃, X₅₆, X₅₉, X₆₀ y X₆₃ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; (d) MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVEX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10), en donde X₅, X₆, X₉, X₁₀, X₁₃, X₁₆, X₁₇, X₃₀, X₃₁, X₃₄, X₃₇, X₃₈, X₄₁, X₅₀, X₅₃, X₅₄, X₅₇, X₆₀ y X₆₁ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; y (e) MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂YZ₂NPEVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11), en donde X₅, X₈, X₉, X₁₂, X₁₅, X₁₆, X₁₉, X₂₈, X₃₁, X₃₂, X₃₅, X₃₈, X₃₉, X₄₂, X₅₂, X₅₃, X₅₆, X₅₉, X₆₀ y X₆₃ son un residuo de aminoácido natural y/o no natural, y Z₁ y Z₂ son de 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales; y en donde el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural. En un ejemplo adicional, X_n es un residuo de aminoácido natural diferente de cisteína o prolina. En un ejemplo adicional, una pluralidad de vectores en la colección codifican una proteína de fusión de DBDpp. En otro ejemplo, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos. En un ejemplo adicional, los diferentes objetivos unidos por el DBDpp codificado por los ácidos nucleicos en la colección se seleccionan del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo de proteína seleccionado del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, la colección comprende ácidos nucleicos que codifican por lo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 o 1000 diferentes DBDpp que se unen específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. En un ejemplo adicional, una pluralidad de los vectores de la colección de vectores está contenida en células hospedantes (que incluyen partículas virales). En otro ejemplo, las células hospedantes (por ejemplo, partículas virales) exhiben el DBDpp sobre su superficie. En un ejemplo adicional, las células hospedantes son fagos que exhiben el DBDpp sobre su superficie. En algunos ejemplos, por lo menos dos, tres, cuatro, cinco o diez de los DBDpp codificados en la colección de vectores se unen específicamente a diferentes objetivos. En algunos ejemplos, el DBDpp se une a un objetivo de interés seleccionado del grupo que consiste de: un ácido nucleico, un oligosacárido, un péptido, una proteína, un antígeno de la superficie celular y una molécula orgánica pequeña. En un ejemplo adicional, el objetivo de DBDpp de interés es una proteína seleccionada del grupo que consiste de: una inmunoglobulina, una enzima, una hormona, una proteína del suero, una proteína de la superficie celular, una proteína terapéutica, un TSA, un CSA y una proteína que contiene una marca de péptido. En un ejemplo adicional, el DBDpp se une específicamente a un objetivo dado a conocer en este documento. También se proporciona una colección de células hospedantes (por ejemplo, partículas virales) que contienen la colección de vectores. En algunos ejemplos, la colección contiene una pluralidad de células hospedantes (por ejemplo, partículas virales) que exhiben el DBDpp sobre su superficie. En ejemplos particulares, las células hospedantes son fagos que exhiben el DBDpp sobre su superficie. En algunos ejemplos, la colección de vectores comprende: (a) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos de interés; (b) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo objetivo de interés; (c) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente al mismo epítipo de un objetivo de interés; (d) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que se unen específicamente a diferentes epítopos de un objetivo de interés; (e) ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 DBDpp que tienen diferentes secuencias que compiten por la unión al mismo objetivo de interés; o (f) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 secuencias de ácidos nucleicos diferentes que codifican la misma secuencia de DBDpp.

Se contempla que el DBDpp se puede modificar para adaptar los polipéptidos al uso específico propuesto, sin apartarse del alcance proporcionado en este documento. Estas modificaciones pueden comprender aminoácidos adicionales en la terminal N o C del DBDpp y/o etiquetas o agentes terapéuticos que se conjugan químicamente o se unen de otra manera al DBDpp. Los residuos de aminoácidos adicionales planteados anteriormente también pueden constituir uno o más dominios de polipéptidos con alguna función deseada, tal como otra función de unión, o una función enzimática, o una función de quelación de iones de metal o una función fluorescente, o mezclas de las mismas.

Selección, Aislamiento e Identificación de DBDpp

También se proporcionan métodos para seleccionar, aislar e identificar DBDpp que se unen específicamente a un objetivo de interés de una pluralidad de DBDpp, tales como aquellos que se encuentran en una colección. En una modalidad, un método de examen de una colección de DBDpp por la unión con un asociado de unión, comprende: (a) obtener una población que exhibe una colección de DBDpp; (b) poner en contacto la población con el objetivo de interés bajo condiciones que son adecuadas para la unión; y (c) identificar aquellos DBDpp que se unen al objetivo. Dos procesos de selección de expresión de DBDpp ejemplares incluyen selección por afinidad y selección de examen basada en células.

En ejemplos ilustrativos proporcionados en este documento, las colecciones de expresión de fagos de DBDpp se preparan y se examinan por DBDpp que tienen propiedades deseadas, que incluyen la capacidad para unirse específicamente a numerosos objetivos terapéuticos y de diagnóstico validados. Los DBDpp representativos que se identifican en estos exámenes se caracterizan adicionalmente y demostraron que exhiben propiedades deseables que son útiles por ejemplo en aplicaciones de purificación, diagnóstico y terapéuticas.

Colección de Expresión

Como se describe en este documento, las sustituciones en el andamiaje de referencia de la SEQ ID NO:1 proporcionan una plataforma de reconocimiento molecular versátil. Estos DBDpp se pueden utilizar en métodos para preparar colecciones de DBDpp las cuales pueden ser examinadas contra objetivos de interés. Estos métodos de examen se pueden utilizar para identificar DBDpp con propiedades deseadas tal como la capacidad para unirse a un objetivo de interés. La población de DBDpp utilizada en la selección de DBDpp específicos para un objetivo puede estar en diferentes formas y puede ser pero no está limitada a colecciones de proteínas, colecciones de ácidos nucleicos, colecciones de vectores y colecciones de células hospedantes.

Varios métodos conocidos en el campo para preparar modificaciones de ácido nucleico se pueden utilizar para preparar (codificar) DBDpp que tienen una modificación en uno o más residuos de aminoácidos en comparación con otros DBDpp y/o el andamiaje de referencia de la SEQ ID NO:1 como se define en las reivindicaciones. Los ácidos nucleicos que codifican los DBDpp se pueden obtener utilizando métodos estándar en el campo, tal como la síntesis química, métodos recombinantes y/o se pueden obtener de fuentes biológicas. Un ácido nucleico de interés se puede colocar bajo el control de uno o más elementos necesarios para su expresión en alguna célula hospedante particular. Una variedad de células hospedantes está disponible para propagar ácidos nucleicos que codifican DBDpp, y los métodos de expresión son conocidos en el campo y se describen en este documento los cuales se pueden utilizar en la expresión de DBDpp sobre su superficie. Los métodos de expresión incluyen sin limitación expresión en fagos, expresión en bacterias, expresión en levadura, expresión en ribosomas y expresión en ARNm.

En algunos ejemplos, la generación de una colección de DBDpp aleatorizada (parcialmente) requiere la aleatorización (parcial) de posiciones específicas dentro de la secuencia de andamiaje de referencia de la SEQ ID NO:1. En ejemplos adicionales, otras secuencias de referencia se pueden utilizar y modificar de acuerdo con los métodos dados a conocer en este documento. En algunos ejemplos, una colección de DBDpp para el uso en los métodos proporcionados en este documento se genera por medio de técnicas de ADN recombinante. En particular, las colecciones de secuencias de ácidos nucleicos que codifican los DBDpp cada una que difiere en secuencia en posiciones de aminoácidos particulares se pueden obtener por medio de la mutagénesis dirigida a un sitio o aleatoria de una secuencia plantilla. Los residuos de aminoácidos aleatorios se pueden introducir en posiciones específicas en una secuencia de aminoácidos utilizando técnicas conocidas en el campo tales como la selección (introducción) de codones "NNK" o "NNS" en posiciones correspondientes en la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos. Los métodos para producir estas colecciones son conocidos en el campo y los servicios comerciales están disponibles para generar estas colecciones. El(los) nucleótido(s) que determina(n) los residuos de aminoácidos relevantes en las posiciones de interés es(son) mutado(s) de diferentes maneras tal como para obtener una colección de secuencias que codifican diferentes DBDpp.

Las colecciones se crean opcionalmente a través de la mutación selectiva o aleatoria de posiciones de secuencia de aminoácidos expuestas a solventes específicas del DBD.

En algunos ejemplos, el número de posiciones de residuos de aminoácidos sustituidos en colecciones de DBDpp proporcionadas en este documento varían de 5 a 20 posiciones de residuos de aminoácidos. De esta manera, un conjunto definido de posiciones de residuos de aminoácidos sustituidos en una colección de DBDpp proporcionada en este documento comprende de 5 a 20 posiciones definidas de residuos de aminoácidos sustituidos, tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 posiciones definidas de residuos de aminoácidos sustituidos. En varios ejemplos, los residuos de aminoácidos sustituidos son aminoácidos naturales o no naturales. En varios ejemplos, se puede utilizar cualquiera de los 20 aminoácidos naturales. Sin embargo, en algunos ejemplos, las sustituciones no dan por resultado el reemplazo de algún aminoácido por una cisteína y/o prolina.

Una colección de DBDpp puede contener cualquier número adecuado de diferentes secuencias de DBDpp. En algunas modalidades, la colección de DBDpp contiene por lo menos 2, por lo menos 5, por lo menos 10, por lo menos 50, por

lo menos 100, por lo menos 1000, por lo menos 10,000, por lo menos 105, por lo menos 106, por lo menos 107, por lo menos 108, por lo menos 109 o más secuencias de DBDpp diferentes (por ejemplo, proteínas de fusión de DBDpp).

El concepto "posición de residuo de aminoácido sustituido", cuando se refiere a una colección de diferentes secuencias de DBDpp, se refiere a una posición de residuo de aminoácido en la cual están ubicados por lo menos dos diferentes tipos de residuos de aminoácidos cuando por lo menos dos de las secuencias de aminoácidos de los diferentes DBDpp de una colección de DBDpp se comparan entre sí.

En un ejemplo, la descripción comprende métodos para producir una colección (es decir, una recolección o una pluralidad) de DBDpp los cuales difieren entre sí en por lo menos uno de un conjunto definido de 5 a 20 posiciones de residuos de aminoácidos sustituidos. Por lo tanto, las secuencias dentro de una colección de DBDpp difieren entre sí en cualquiera de una o más posiciones de aminoácidos particulares que están comprendidas en un conjunto seleccionado, definido o aleatorio. Por consiguiente, el término "diferentes secuencias" o "diferentes secuencias de DBDpp" se refiere a la aparición de una variación de secuencia o diferencias de secuencias en un conjunto definido de posiciones de residuos de aminoácidos entre dos o más DBDpp en una colección.

Vehículo de Expresión

La población o colección de moléculas es expresada en un vehículo de expresión típico (por ejemplo, bacteriófago, E. coli, ribosoma) que facilita el acoplamiento del fenotipo al genotipo.

En algunos ejemplos, los DBDpp de la colección son expresados sobre la superficie de una partícula de fago, un ribosoma, una bacteria, una célula de levadura, una célula de mamífero o cualquier otro (micro)organismo adecuado, con el fin de facilitar el examen o selección para aislar las secuencias de DBDpp deseadas que tienen afinidad de unión detectable por, o actividad in vitro detectable sobre el objetivo de interés. Una ventaja principal de esta tecnología es el acoplamiento del genotipo (es decir, el ADN encapsulado que codifica la proteína expresada) y el fenotipo (es decir, la proteína expresada tal como un DBDpp proporcionado en este documento) que permite la selección basada en la afinidad de colecciones con millones a trillones de variantes de polipéptidos en un ensayo in vitro relativamente simple.

Los métodos, técnicas y organismos hospedantes adecuados para la expresión y selección o examen de una colección de secuencias de DBDpp o secuencias de nucleótidos sustituidas que codifican estas secuencias de DBDpp sustituidas, y los cuales son aplicables a DBDpp que tienen cualidades deseadas, son conocidos para la persona experta en el campo. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Georgiou, Nat. Biotechnol. 15:29-34 (1997); Wittrup, Curr. Opin. Biotechnol. 12:395-399 (2001); Lipovsek y Pluckthun, J Immunol Methods 290:51-67 (2004); Reiersen, Nucl Acids Res, 33: e10, 2005; Levin, Mol BioSyst, 2:49-57 (2006); Bratkovic, Cell. Mol. Life. Sci. 67:749-767 (2010). Por ejemplo, la tecnología de expresión en colecciones de fagos, y la selección por medio de una técnica de expresión en fagos se pueden seleccionar como un método para la identificación de alto rendimiento de sustancias aglutinantes específicas para proteínas, debido a que es una de las técnicas de selección más robustas y versátiles disponibles (Scott, Science 249:386-390 (1990); Bratkovic, Cell. Mol. Life Sci. 67:749-767 (2010)).

Adicionalmente, la tecnología de expresión se puede utilizar para alterar, por ejemplo para mejorar las propiedades de unión de DBDpp. Véase, por ejemplo, Scott, Science 249:386 (1990); Devlin, Science 249:404 (1990); Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,223,409, 5,733,731, 5,498,530, 5,432,018, 5,338,665 y 5,922,545; documentos WO 96/40987 y WO 98/15833, los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad. En colecciones de expresión en fagos de péptidos, las secuencias de péptidos de origen natural y/o no natural se pueden expresar por medio de la fusión con proteínas de revestimiento de fago filamentoso. Los péptidos expresados se pueden eluir por afinidad contra un objetivo de interés si se desea. El fago retenido puede ser enriquecido por medio de rondas sucesivas de purificación por afinidad y repropagación. El DBDpp que se une mejor puede ser secuenciado para identificar residuos clave y las colecciones de mutagénesis se pueden crear y examinar para optimizar adicionalmente la secuencia de las mejores sustancias aglutinantes. Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:401-24 (1997).

Propagación en Fagos

Un protocolo típico de propagación en fagos involucra el uso de un sistema de expresión en la superficie de fagos filamentosos (fagémidos), la producción de partículas de fagos en un hospedante bacteriano con cada partícula que expresa el producto génico de un miembro de la colección de genes como una fusión con un tipo de sus proteínas de revestimiento (proteínas gIII o gVIII). Una colección de partículas de fagos se conduce a través de un proceso de selección para la unión a una molécula objetivo inmovilizada ("purificación por afinidad") que implica la unión de la colección de fagos al objetivo, pasos de lavado para retirar los DBDpp no unidos a fagos y la elución de partículas unidas. Usualmente son necesarias varias rondas de selección por afinidad para seleccionar moléculas con las características deseadas que incluyen la reamplificación del fago eluido en el hospedante bacteriano y la selección en el objetivo inmovilizado.

Por ejemplo, utilizando una expresión en fagémidos (Kay y colaboradores, Phage Display of Peptides and Proteins. A

Laboratory Manual, B.K. Kay y colaboradores 1996) una colección de DBDpp determinada puede ser representada por una recolección de fagémidos cada uno de los cuales codifica una proteína de fusión que comprende un miembro de la colección de DBDpp fusionado a la proteína de revestimiento menor pIII. Estos fagémidos se pueden introducir en células de *E. coli* adecuadas (por ejemplo TG1) por medio de la electroporación u otros medios. Utilizando la infección con fagos auxiliares, se producen fagos (empacando también el genoma de fagémidos) que expresan la proteína de fusión de DBDpp. Estos fagos se puede utilizar para seleccionar sustancias aglutinantes contra un objetivo determinado y el fago seleccionado se puede propagar al infectar las células TG1 de *E. coli* (Stratagene).

De esta manera, en ejemplos particulares, se proporcionan colecciones de DBDpp como una colección de fagos y los DBDpp que se unen se identifican al poner en contacto los fagos con el objetivo etiquetado de interés, después de lo cual los fagos que se unen son recuperados por medio de la detección o recolección selectiva del objetivo unido, etiquetado. En un ejemplo, se utiliza un objetivo biotinilado, por medio del cual los fagos los cuales generan un DBDpp que se une específicamente al objetivo son capturados con un soporte revestido con estreptavidina (por ejemplo, cuentas magnéticas). En algunos ejemplos, los pasos de selección de los métodos para producir uno o más DBDpp que tienen afinidad de unión detectable por un objetivo de interés, pueden comprender el enriquecimiento (adicional) de la colección de DBDpp o la mezcla de colecciones de DBDpp para DBDpp que tienen afinidad de unión detectable por el objetivo de interés mediante la ejecución iterativa de los pasos de contacto de un objetivo de interés con una colección de DBDpp o con una mezcla de colecciones de DBDpp (que incluyen una pluralidad de DBDpp) de la invención y subsecuentemente identificación de la colección de DBDpp o mezcla de colecciones de DBDpp que se ponen en contacto con la proteína, uno o más DBDpp que tienen afinidad de unión detectable por el objetivo de interés. El paso de selección de un DBDpp que tiene actividad in vitro detectable por medio de la interacción con un objetivo de interés puede comprender: (a) poner en contacto una colección de DBDpp o una mezcla de colecciones de DBDpp de la invención con la citocina o factor de crecimiento o receptor de citocina o factor de crecimiento de interés, y (b) identificar de la colección de DBDpp o mezcla de colecciones de DBDpp, uno o más de los DBDpp que tienen actividad in vitro detectable sobre el objetivo de interés.

En ejemplos ilustrativos dados a conocer en este documento en los ejemplos, los métodos de expresión en fagos se utilizan para expresar y examinar DBDpp por la capacidad para unirse específicamente a un objetivo de interés.

Se demuestra en este documento que el dominio de DBD puede ser expresado y seleccionado en la superficie de fagos. Diferentes colecciones de DBDpp, basadas en el andamiaje de la SEQ ID NO:1, y descritas en este documento en los ejemplos, se prepararon y se sujetaron a métodos de expresión en fagos para demostrar que se pueden producir DBDpp que se unen específicamente a diferentes objetivos de interés que incluyen CD137, CD47, CTLA4, DR5, KIR, PD-L1, PD1 y TIM3.

Expresión en Células

En algunos ejemplos, las técnicas de examen de colecciones incluyen un sistema de expresión en la superficie celular. El sistema de expresión en la superficie celular puede comprender células procarióticas, tales como células Gram+, o células eucarióticas, tales como células de levadura. Numerosos sistemas de expresión en la superficie celular son conocidos en el campo y se pueden adaptar de manera rutinaria para examinar colecciones de DBDpp. Los sistemas procarióticos se describen, por ejemplo, en Francisco y colaboradores, PNAS 90:10444-10448 (1993) y Lee y colaboradores, Trends Biotechnol 21:45-52 (2003). Los sistemas eucarióticos se describen por ejemplo en Boder y colaboradores, Nat. Biotechnol. 15:553-557 (1997) y Gai y colaboradores, Curr. Opin. Struct. Biol. 17:467-473 (2007). Los métodos de "expresión en *E. coli*" tal como la fusión de lipoproteínas asociadas con peptidoglicanos (PAL, por sus siglas en inglés) también están comprendidos en este documento. Por ejemplo, un péptido de DBDpp se puede fusionar a la terminal carboxilo del represor lac y se puede expresar en *E. coli*.

Las tecnologías de expresión en bacterias y expresión en levadura conocidas en el campo permiten la expresión de proteínas recombinantes sobre la superficie de células de levadura *S. cerevisiae* (Boder, Nat. Biotechnol. 15:553-557 (1997) o bacterias (*E. coli*, *Staphylococcus carnosus*) (Daugherty, 1998, Wernerus, Appl. Environ. Microbiol. 69(9):5328-5335 (2003)) como una fusión con el receptor de adhesión de levadura de a-aglutinina o una proteína de membrana exterior bacteriana (OMP, por sus siglas en inglés) respectivamente.

En algunos ejemplos, las proteínas de fusión expresadas también contienen una marca de péptido que permite la cuantificación de la expresión en la superficie de la colección por medio de la citometría de flujo. Combinado con el etiquetado fluorescente indirecto del ligando, el etiquetado anti-marca permite la clasificación de células por medio de FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia) y la determinación de las afinidades de unión de las interacciones (Feldhaus y colaboradores, Nat. Biotechnol. 21:163-70 (2003); Wernerus y colaboradores Appl. Environ. Microbiol. 69(9):5328-35 (2003)).

Expresión In vitro

Los métodos de expresión in vitro (también conocidos como libres de células o acelulares) también se pueden emplear para seleccionar, aislar e identificar DBDpp que se unen a un objetivo de interés. En un ejemplo, la traducción de ARN aleatorio es detenida antes de la liberación de ribosoma, dando por resultado una colección de polipéptidos con su

ARN asociado aún adherido. Este método y métodos relacionados son referidos colectivamente como "expresión en ribosoma". Otros métodos conocidos emplean la vinculación química de péptidos al ARN. Véase, por ejemplo, Roberts y colaboradores, PNAS 94:12297-303 (1997). Este método y métodos relacionados son referidos colectivamente como "examen de ARN-péptido, expresión en ARN y expresión en ARNm". Alternativamente, los métodos de expresión in vitro pueden emplear ADN como el componente genético al cual se acopla el polipéptido expresado. Un método conocido como cis-expresión proporciona la selección in vitro de péptidos de colecciones de complejos de proteína-ADN y se describe en el documento US7842476 B2, los contenidos del cual se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad. Se han desarrollado colecciones de péptidos derivados químicamente en las cuales los péptidos son inmovilizados sobre materiales no biológicos, estables, tales como barras de polietileno o resinas permeables a solventes. Otra colección de péptidos derivada químicamente utiliza la fotolitografía para explorar péptidos inmovilizados sobre portaobjetos. Estos métodos y métodos relacionados son referidos colectivamente como "examen de péptidos químicos". El examen de péptidos químicos puede ser ventajoso debido a que permite el uso de D-aminoácidos y otros análogos no naturales, así como también elementos no peptídicos. Los métodos tanto biológicos como químicos se revisan en Wells, Curr. Opin. Biotechnol. 3:355-362 (1992).

Selección de DBDpp

La purificación por afinidad es un método de selección y examen iterativo conocido para enriquecer una población inicial de moléculas diferentes (tal como una colección de DBDpp) para moléculas que tienen una afinidad por un objetivo preferido. Se permite que los miembros de la colección que tienen afinidad por el objetivo se unan. Los miembros unidos de manera no específica o débil son deslavados del soporte. Luego los miembros unidos de la colección son recuperados (por ejemplo, por medio de la elución) del soporte. Los miembros recuperados de la colección son recolectados para el análisis adicional (por ejemplo, examen) o reunidos para una ronda adicional de selección.

En un ejemplo, el objetivo es capturado sobre el soporte sólido después de la incubación con la colección de fagos. La inmovilización del objetivo se puede realizar por medio de muchos métodos diferentes conocidos en el campo. Los ejemplos de soporte sólido son placas o tubos de microtitulación (por ejemplo placas Maxisorp^{MR}, tubos Maxisorp^{MR}, Nunc) o cuentas magnéticas (Dynabead^{MR}, Invitrogen). El objetivo puede ser revestido ya sea directamente sobre el plástico o las cuentas (Dynabeads^{MR} activadas en la superficie, por ejemplo Dynabeads M270 Epoxy^{MR}, Invitrogen) o a través de estreptavidina cuando el objetivo es biotinilado (por ejemplo Dynabeads MyOne Streptavidin T1^{MR}, Invitrogen).

Además el objetivo puede ser unido de manera no covalente a la cuenta a través de una molécula de afinidad intermedia tal como un anticuerpo o proteína A dirigido contra el objetivo o una marca de péptido asociada con el objetivo. Las marcas de péptido tales como marcas de His o alternativamente, un anticuerpo dirigido contra un objetivo también se pueden utilizar para capturar el objetivo sobre el soporte. Estas marcas de péptido alternativas también son compatibles con las Dynabeads^{MR} (aislamiento y extracción de marcas de His de Dynabeads^{MR}, Invitrogen) y Dynabeads^{MR} acopladas a proteína A o proteína G (Dynabeads^{MR}-proteína A/G, Invitrogen). Para inmovilizar el objetivo sobre cuentas magnéticas, se siguen las recomendaciones del fabricante para cada tipo específico de cuenta.

El paso de captura entonces puede consistir en atrapar el objetivo en cuentas magnéticas revestidas, capturando de ese modo fagos unidos indirectamente al objetivo. La interacción de objetivo-fagos se realiza en solución. Para poder deslavar el fago no unido, el objetivo necesita ser inmovilizado sobre un soporte sólido. La inmovilización del objetivo en el método de purificación por afinidad soluble es idéntica a las posibilidades de inmovilización en los protocolos de purificación por afinidad directa.

Un protocolo de purificación por afinidad clásico consiste de 2, 3 a 5 o más rondas de selección, dependiendo del tipo de objetivo y colección. Cada ronda de selección consiste de pasos típicamente diferentes: (1) inmovilización del objetivo preferido en un soporte. Este paso es opcional, ya que la purificación por afinidad también se puede realizar en un formato en donde el objetivo no es inmovilizado pero es mantenido en solución (en caso de un objetivo soluble) o permanece anclado sobre una célula (en caso de por ejemplo un objetivo anclado a una membrana tal como un receptor), (2) incubación de la colección con el objetivo, (3) pasos de lavado para eliminar sustancias aglutinantes no específicas, (4) elución opcional de las sustancias aglutinantes y (5) amplificación de las sustancias aglutinantes eluidas del paso (4) o del paso (3) (en caso del paso (4)) se omitió en rondas de examen consecutivas). Los pasos 1 a 5 serán repetidos dos, tres, cuatro o más veces para el aislamiento de las sustancias aglutinantes específicas para objetivos de colecciones iniciales. Después de la purificación por afinidad, la especificidad por un objetivo de las sustancias aglutinantes aisladas de las diferentes rondas de selección se analiza típicamente en ensayos ELISA o ensayos similares.

En un ejemplo, un método de examen para DBDpp que se unen específicamente a un objetivo de interés comprende los pasos de: (a) contacto de un objetivo de interés con una pluralidad de DBDpp; e (b) identificación de un DBDpp que se une específicamente al objetivo de interés. El paso de contacto del objetivo de interés con la pluralidad de DBDpp puede ser efectuado de cualquier manera conocida en el campo. En un ejemplo, el objetivo de interés se inmoviliza sobre un soporte sólido y se pone en contacto una solución que contiene la pluralidad de moléculas de DBDpp con el objetivo de interés inmovilizado. Este procedimiento es semejante a un proceso cromatográfico de

afinidad, en donde la matriz de afinidad está comprendida del objetivo de interés inmovilizado. Los DBDpp que tienen una afinidad selectiva por el objetivo de interés entonces pueden ser purificados utilizando técnicas conocidas en el campo, tal como la selección por afinidad. La composición del soporte sólido, el proceso para adherir el objetivo de interés al soporte sólido, y los reactivos, condiciones y métodos para examinar y aislar los DBDpp que tienen una afinidad selectiva por un objetivo de interés son convencionales en gran medida y son conocidos para aquellas personas de experiencia ordinaria en el campo. En ciertas situaciones, puede ser deseable deslavar cualquier DBDpp no unido de una mezcla del objetivo de interés y/o uno o más DBDpp unidos al objetivo de interés antes de intentar determinar o detectar la presencia de una interacción de afinidad selectiva. Este paso de lavado puede ser particularmente deseable cuando el objetivo de interés está unido a un soporte sólido.

Se entenderá que el paso de selección de los métodos descritos en este documento se puede realizar por medio de un método conocido comúnmente como un método de selección o por medio de un método conocido comúnmente como un método de examen. Ambos métodos contemplan la identificación y aislamiento subsecuente (por ejemplo, el paso de selección) de los componentes deseables (por ejemplo, miembros de la colección de DBDpp) de un ensamble original que comprende componentes tanto deseables como no deseables (por ejemplo, una colección de DBDpp). En caso de un método de selección, los miembros de la colección serán aislados típicamente por medio de un paso en donde la propiedad deseada se aplica para obtener el objetivo deseado; en este caso, la propiedad deseada es restringida usualmente a la propiedad de una alta afinidad por un objetivo de interés determinado. Este método es conocido generalmente como un método de selección por afinidad y, este método de selección por afinidad será aplicado a una colección de DBDpp con el propósito de seleccionar DBDpp que tengan una alta afinidad por un objetivo de interés. En ejemplos adicionales, la colección se examina por DBDpp que tienen propiedades cinéticas deseadas tales como una alta constante de afinidad para la unión a un objetivo de interés determinado, o una baja constante de disgregación para miembros de la colección unidos al objetivo al ajustar las condiciones de selección apropiadas (por ejemplo tiempos de incubación cortos o ciclos de lavado largos, u otras condiciones como es sabido por alguna persona experta en el campo de las técnicas de selección de colecciones). Alternativamente, en caso de un método de examen, los miembros de la colección serán aislados típicamente por medio de un paso en donde todos los miembros de la colección, o por lo menos una recolección sustancial de los miembros de la colección, son examinados individualmente con respecto a una propiedad deseada determinada, y en donde los miembros que tienen esta propiedad deseada son retenidos mientras que los miembros no tienen esta propiedad deseada son desechados; en tal caso, y en el contexto proporcionado en este documento, las propiedades deseadas pueden relacionarse ya sea con una alta afinidad por un objetivo de interés, o una actividad funcional tal como la inhibición, reducción y/o prevención de la actividad de un objetivo de interés. Por consiguiente, se afirma que el paso de selección de los métodos se puede realizar ya sea por medio de una técnica de selección (por afinidad) o por medio de una técnica de examen funcional basado en la afinidad o basado en la actividad, ambas técnicas dan por resultado la selección de uno o más DBDpp que tienen propiedades de afinidad o actividad benéficas (favorables, deseables, superiores) en comparación con los DBDpp no seleccionados de los DBDpp.

Examen de DBDpp

Después de la selección, los miembros identificados de la colección pueden ser aislados y examinados individualmente.

Un examen difiere de una selección en que un examen se caracteriza por el análisis individualmente de miembros de la colección (o en reservas) mientras que una selección se caracteriza por el análisis de miembros de la colección que son separados de otros miembros durante el proceso (por ejemplo, retenidos, eluidos o lavados completamente). En un ejemplo, una recolección de miembros de la colección se examina directamente, sin ser sujeta a un paso de selección. Este planteamiento, por ejemplo, se puede utilizar durante protocolos de maduración por afinidad que son conocidos y se pueden aplicar de manera rutinaria.

La capacidad de un DBDpp para unirse específicamente a un objetivo de interés se puede determinar mediante el uso o la modificación de manera rutinaria de ensayos y otras metodologías descritas en este documento o conocidas de otra manera en el campo. Por ejemplo, la interacción de DBDpp-objetivo se puede someter a ensayo como se describe en los Ejemplos posteriores o alternativamente, mediante el uso de ensayos de unión in vitro o in vivo tales como inmunotransferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente vinculado con enzimas), inmunoensayos de "emparedado", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, inmunohistoquímica (IHC) y análisis BIAcore. Similarmente, la capacidad de un DBDpp para unirse específicamente a un objetivo de interés y para alterar la actividad biológica del objetivo se puede determinar mediante el uso o la modificación de manera rutinaria de ensayos y otras metodologías descritas en este documento o conocidas de otra manera en el campo. Los ensayos para evaluar la capacidad de un DBDpp para afectar funcionalmente su objetivo (por ejemplo, ensayos para medir la señalización, proliferación, migración, etcétera) también se pueden utilizar para evaluar indirectamente la interacción de DBDpp-objetivo. Adicionalmente, los DBDpp se pueden identificar con base en sus efectos en ensayos que miden vías o actividades particulares. Por ejemplo, los ensayos que miden las vías de señalización (por ejemplo, estudios de fosforilación o multimerización), flujos de canales de iones, niveles intracelulares de cAMP, actividades celulares tales como emigración, adherencia, proliferación o apoptosis, y entrada, replicación, germinación o integración de virus se pueden utilizar para identificar, caracterizar y mejorar las propiedades deseadas de los DBDpp. La capacidad de un DBDpp para inhibir de manera competitiva otra secuencia

que contiene DBDpp se puede determinar utilizando técnicas conocidas en el campo, que incluyen un ensayo ELISA y análisis BIAcore.

Identificación de DBDpp

Donde un candidato de DBDpp contenido en una colección de DBDpp, es expresado en una célula o fago o partícula adecuado, la secuencia de decodificación de ácidos nucleicos se puede aislar y se puede determinar de manera rutinaria. Es posible aislar de la célula o fago o partícula, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de DBDpp. De esta manera, la secuencia de nucleótidos del(los) miembro(s) seleccionado(s) de la colección de DBDpp se puede determinar por medio de métodos de secuenciación rutinarios.

Los miembros de la colección de DBDpp que son específicos para el objetivo se pueden caracterizar por medio de la secuenciación de ácidos nucleicos. La información de secuencia se utiliza para clasificar los miembros y para retirar miembros redundantes (es decir, miembros que codifican ese mismo DBDpp). Las colecciones de DBDpp y los miembros de las colecciones (que incluyen algunos miembros en los cuales se ha agregado una marca de epitopo) de acuerdo con varios ejemplos incluyen, pero no están limitados a aquellos identificados a continuación en la Tabla 1. Están incluidos adicionalmente aquellos DBDpp que corresponden a cualquiera de las SEQ ID NOS: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11, en donde una o más de las posiciones X_n son sustituidas por un aminoácido natural o no natural. En algunos ejemplos, los DBDpp que corresponden a cualquiera de las SEQ ID NOS: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 no incluyen residuos de cisteína y/o prolina que son sustituidos en una posición X_n .

Tabla 1 - Ejemplos no Limitantes de Colecciones de DBDpp y Miembros de Colecciones

SEQ ID NO	Secuencia	Objetivo	Colección
2	MGSWX ₅ X ₆ FKX ₉ X ₁₀ LAX ₁₃ IKX ₁₆ X ₁₇ LEALGGSEAELAX ₃₀ FEX ₃₃ X ₃₄ IAX ₃₇ FEX ₄₀ X ₄₁ LQX ₄₄ YKGGKNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN		F1
3	MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFX ₃₂ X ₃₃ EIX ₃₆ AFX ₃₉ X ₄₀ ELX ₄₃ AYKGGKNPEVEALX ₅₇ X ₅₈ EAX ₆₁ AIX ₆₄ X ₆₅ ELX ₆₈ AYRHN		F2
4	MGSWX ₅ EFX ₈ X ₉ RLX ₁₂ AIX ₁₅ X ₁₆ RLX ₁₉ ALGGSEAELAAFEKEIAAFESELQAYKGGKNPEVEX ₅₅ LRX ₅₈ X ₅₉ AAX ₆₂ IRX ₆₅ X ₆₆ LQAYRHN		F3
5	MGSWX ₅ X ₆ FKX ₉ X ₁₀ LAX ₁₃ IKX ₁₆ X ₁₇ LEALGGSEAELAAFX ₃₂ X ₃₃ EIX ₃₆ AFX ₃₉ X ₄₀ ELX ₄₃ AYKGGKNPEVEX ₅₅ LRX ₅₈ X ₅₉ AAX ₆₂ IRX ₆₅ X ₆₆ LQAYRHN		C1
6	MGSWX ₅ EFX ₈ X ₉ RLX ₁₂ AIX ₁₅ X ₁₆ RLX ₁₉ ALGGSEAELAX ₃₀ FEX ₃₃ X ₃₄ IAX ₃₇ FEX ₄₀ X ₄₁ LQX ₄₄ YKGGKNPEVEALX ₅₇ X ₅₈ EAX ₆₁ AIX ₆₄ X ₆₅ ELX ₆₈ AYRHN		C2
7	MGSWX ₅ X ₆ FKX ₉ X ₁₀ LAX ₁₃ IKX ₁₆ X ₁₇ LEALZ ₁ EAELAX ₂₈ FEX ₃₁ X ₃₂ IAX ₃₅ FEX ₃₈ X ₃₉ LQX ₄₂ YZ ₂ NPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN		
8	MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ ₁ EAELAAFX ₃₀ X ₃₁ EIX ₃₄ AFX ₃₇ X ₃₈ ELX ₄₁ AYZ ₂ NPEVEALX ₅₂ X ₅₃ EAX ₅₆ AIX ₅₉ X ₆₀ ELX ₆₃ AYRHN		
9	MGSWX ₅ EFX ₈ X ₉ RLX ₁₂ AIX ₁₅ X ₁₆ RLX ₁₉ ALZ ₁ EAELAAFEKEIAAFESELQAYZ ₂ NPEVEX ₅₀ LRX ₅₃ X ₅₄ AAX ₅₇ IRX ₆₀ X ₆₁ LQAYRHN		
10	MGSWX ₅ X ₆ FKX ₉ X ₁₀ LAX ₁₃ IKX ₁₆ X ₁₇ LEALZ ₁ EAELAAFX ₃₀ X ₃₁ EIX ₃₄ AFX ₃₇ X ₃₈ ELX ₄₁ AYZ ₂ NPEVEX ₅₀ LRX ₅₃ X ₅₄ AAX ₅₇ IRX ₆₀ X ₆₁ LQAYRHN		
11	MGSWX ₅ EFX ₈ X ₉ RLX ₁₂ AIX ₁₅ X ₁₆ RLX ₁₉ ALZ ₁ EAELAX ₂₈ FEX ₃₁ X ₃₂ IAX ₃₅ FEX ₃₈ X ₃₉ LQX ₄₂ YZ ₂ NPEVEALX ₅₂ X ₅₃ EAX ₅₆ AIX ₅₉ X ₆₀ ELX ₆₃ AYRHN		
12	MGSWVEFGHRLWAIDQRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESELQAYKGKGNPEVEKLQRRAAFIRFRLQAYRHN	CD137	F3
13	MGSWVEFANRLWAIDQRLFALGGSEAELAAFEKEIAAFESELQAYKGKGNPEVEHLRDQAAFIRHKLQAYRHN	CD137	F3
14	MGSWYEFHRLWAIDQRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESELQAYKGKGNPEVEGLREAAAFIRAKLQAYRHN	CD137	F3
15	MGSWYEFHRLWAIDQRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESELQAYKGKGNPEVEALRAKAAAYIRWKLQAYRHN	CD137	F3
16	MGSWFEFNHRLWAINERLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESELQAYKGKGNPEVERLSMAAFIRYKLQAYRHN	CD137	F3
17	MGSWYEFHRLWAIDQRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESELQAYKGKGNPEVEYLRETAHIRTQLQAYRHN	CD137	F3
18	MGSWYEFHYRLHAIDQRLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESELQAYKGKGNPEVEELRIKAAAFIRDRLQAYRHN	CD137	F3

(continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	Objetivo	Colección
19	MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAEALAAFLGEIWAFFEMELAAAYK GKGNPEVEALGREAAAIRMELQAYRHN	CD137	F2
20	MGSWYEFDLRLHAIYDRLVALGGSEAEALAAFEKEIAAFESSELQAYKG KGNPEVEILRDNAAYIRQMLQAYRHN	CD47	F3
21	MGSWTEFTYRLSAIEWRLWALGGSEAEALAWFEQKIAFFEDFLQYYK GKGNPEVEALKHEAGAILNELMAYRHN	CD47	C2
22	MGSWAEFDHRLHAIRERLHALGGSEAEALAAFEKEIAAFESSELQAYKG KGNPEVEILRGNAAYIRALLQAYRHN	CD47	F3
23	MGSWTEFVGRLLAAIEFRLWALGGSEAEALAWFEAHIAFFEDYLQWYK GKGNPEVEALREEAGAIMHEELKAYRHN	CD47	C2
24	MGSWTEFYRSLAEIWWRLQALGGSEAEALAMFEDRIAHFEWFLQYYK GKGNPEVEALHHEEAIAIRKELAAAYRHN	CD47	C2
25	MGSWHEFDRLQAIHERLYALGGSEAEALAAFEKEIAAFESSELQAYKG KGNPEVESLRIAAAHIRQVLQAYRHN	CTLA4	F3
26	MGSWNYFKDHLAWIKNSLEALGGSEAEALAHFETAIASFERQLQEYKG KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1
27	MGSWLYFKEHLAHIKAWLEALGGSEAEALAHFELAIADFEYHLQEYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1
28	MGSWVYFKELHLAWIKTELEALGGSEAEALAHFEHSIADFEMSLQFYKG KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1
29	MGSWFYFKQHLAWIKSYLEALGGSEAEALAHFERAIAAFEQHLQMYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1
30	MGSWHYFKDHLAEIKGLLEALGGSEAEALAHFEMAIAADFEHNLQYYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1
31	MGSWHYFKGHLAEIKNHLEALGGSEAEALAHFERAIAAFERSLQWYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1
32	MGSWIYFKELHAYIKKELEALGGSEAEALAHFESAIAVFEHLQYYKGK GNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1
33	MGSWTYFKELHAEIKYMLEALGGSEAEALAHFEVAIADFEKMLQYYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1
34	MGSWWLFKDHLAEIKTALEALGGSEAEALAHFEMAIAAFEKQLQYYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1
35	MGSWSEFYNRDLAIESRLALGGSEAEALALFEIQIARFEKVLQAYKGK GNPEVEALRGEARAIFAELYAYRHN	KIR	C2
36	MGSWYEFYNRLYAIEIRLYALGGSEAEALAAFEKEIAAFESSELQAYKG KGNPEVERLRVRAAKIRVILQAYRHN	KIR	F3
37	MGSWLWFKIFLAEIKYFLEALGGSEAEALAAFDFEIHAFHVELFAYKGK GNPEVEVLREVA AEIRWDLQAYRHN	KIR	C1
38	MGSWTEFQSRDLAIHSRLRALGGSEAEALAAFEKEIAAFESSELQAYKG KGNPEVELLRDDAAFIRHFLQAYRHN	PD-L1	F3
39	MGSWQEFDDRLNAIKARLQALGGSEAEALAAFEKEIAAFESSELQAYKG KGNPEVEDLRDDAAFIRRFLQAYRHN	PD-L1	F3
40	MGSWYEFQNRHLHAIHERLNALGGSEAEALAAFEKEIAAFESSELQAYKG KGNPEVELLRDDAAFIRHFLQAYRHN	PD-L1	F3
41	MGSWFEFQDRLTAINERLSALGGSEAEALAAFEKEIAAFESSELQAYKGK GNPEVETLRSDAAFIRRFLQAYRHN	PD-L1	F3
42	MGSWYEFESRLDAIHERLHALGGSEAEALAAFEKEIAAFESSELQAYKG KGNPEVENLRGDAAFIRHFLQAYRHN	PD-L1	F3
43	MGSWYEFNHRDLAISKRLNALGGSEAEALAAFEKEIAAFESSELQAYKG KGNPEVEELRGDAAFIRHFLQAYRHN	PD-L1	F3
44	MGSWFEFENRLHAIHVRLGALGGSEAEALAAFEKEIAAFESSELQAYKG KGNPEVETLRADAAFIRHYLQAYRHN	PD-L1	F3

(continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	Objetivo	Colección
45	MGSWVVFVKVDLATIKYILEALGGSEAEAEFEGEIAGFEYSLQFYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	TIM3	F1
46	MGSWTIFKEWLAFIKTDLEALGGSEAEAEFEGWIASFEMELQKYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	PD1	F1
47	MGSWVMFKWLLADIKSHLEALGGSEAEAEFEGFIAAFETHLQVYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	PD1	F1
48	MGSWYAFKDYLDIKGWLEALGGSEAEAEFEIFIARFELELQAYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	PD1	F1
49	MGSWAEFKQRLAAIKTRLQALGGSEAEAAFEKEIAAFESLQAYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	Ninguno	
51	MGSWVEFGHRLWAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESLQAYKGKGNPEVEKLRQRAAFIRFRLQAYRHNGGGGSHHHHHH	CD137	F3
52	MGSWVEFANRLWAIDQRLFALGGSEAEAAFEKEIAAFESLQAYKGKGNPEVEHLRDQAAFIRHKLQAYRHNGGGGSHHHHHH	CD137	F3
53	MGSWYEFRLHRLWAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESLQAYKGKGNPEVEGLREAAAFIRAKLQAYRHNGGGGSHHHHHH	CD137	F3
54	MGSWYEFMSRLWAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESLQAYKGKGNPEVEALRAKAAAYIRWKLQAYRHNGGGGSHHHHHH	CD137	F3
55	MGSWFEFNHRLWAINERLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESLQAYKGKGNPEVERLRSMAAFIRYKLQAYRHNGGGGSHHHHHH	CD137	F3
56	MGSWYEFHRLWAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESLQAYKGKGNPEVEYLRETAahirTRLQAYRHNGGGGSHHHHHH	CD137	F3
57	MGSWYEFHYRLHAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESLQAYKGKGNPEVEELRIKAAFIRDRLQAYRHNGGGGSHHHHHH	CD137	F3
58	MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAEAAFLGEIWAFFEMELAAAYKGKGNPEVEALGREAAAIRMELQAYRHNGGGGSHHHHHH	CD137	F2
60	MGSWIEFEDRLDAITDRLWALGGSEAEAEFEHQIAFFEDLQWYKGKGNPEVEALHMEAEAIMDELHAYRHN	CD123	C2
61	MGSWVEFEYRLDAISDRLWALGGSEAEAEFFENEIASFESDLQFYKGKGNPEVEALMFEAEIDDELHAYRHN	CD123	C2
62	MGSWYEFEDRLAAIEARLWALGGSEAEADFEIEIAYFEHGLQWYKGKGNPEVEALESEAMAIDDELHAYRHN	CD123	C2
63	MGSWYEFEDRLDAIEDRLIALGGSEAEALAFEDIIAFEQDLQYYKGGKNPEVEALEMEAEAISIELDAYRHN	CD123	C2
64	MGSWWFEFEDRLWAIDRRLMALGGSEAEALAVFEQMIHFEQILQVYKGKGNPEVEALHFEAHAIGMELAAAYRHN	CD123	C2
65	MGSWEEFHERLDAIDERLEALGGSEAEAEFFEDDIASFEDWLQWYKGKGNPEVEALSREADAINFELEAYRHN	CD123	C2
66	MGSWEEFDKRLDAITRRLMALGGSEAEAEFESTIAWFEDLQYKGGKGNPEVEALDWEAYAIDYELGAYRHN	CD123	C2
67	MGSWSEFVDRDLAIFDRLWALGGSEAEALAFEDTIAHFEWNLQYKGGKGNPEVEALNGEADAITDELHAYRHN	CD123	C2
68	MGSWWEFTDRLDAIFDRLWALGGSEAEALAFEEISIAIFEQDLQYYKGGKGNPEVEALEYEANAIQYEELEAYRHN	CD123	C2
69	MGSWWEFTDRLEAIEDRLWALGGSEAEALAHFEDSIAQFEQELQWYKGKGNPEVEALADEADAIESELHAYRHN	CD123	C2
70	MGSWWFKSDLASIKWELEALGGSEAEALAFEHDIHAEFEEDLQWYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
71	MGSWDHFKNDLAWIKKHLEALGGSEAEALAEFEAVIAYFELYLQGYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
72	MGSWEFFKEVLAEIKYDLEALGGSEAEALAFETDIAGFEIDLQVYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1

(continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	Objetivo	Colección
73	MGSWYDFKEDLADIKWMLEALGGSEAELAEFENVIAFYFENDLQEYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
74	MGWSFFKDDLAEIKYFLEALGGSEAELAMFEQTIAEFYDLQDYKG KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
75	MGSWVTFKDELADIKDFLEALGGSEAELAFFEVDIAEFEAELQFYKG KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
76	MGSWSWFKEDLADIKFELEALGGSEAELAWFELDIADFEQALQYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
77	MGSWWFKEDLAEIKWFLEALGGSEAELAWFEHDIKFEFELQYYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
78	MGSWDEFKEDLAHIKTDLEALGGSEAELALFEDEIADFEMYLQHYKG KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
79	MGSWFMFKDELADIKDWLEALGGSEAELASFESYIAWFEQDLQWYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
80	MGSWQIFKGELAYIKQYLEALGGSEAELAFFEFDIAEFEDLQYYKGK GNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
81	MGSWYIFKEDLAEIKEELEALGGSEAELAYFEEIALFEMELQWYKG KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
82	MGSWYFFKDELADIKWDLEALGGSEAELAWFEMLIAQFELDLQWY KGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
83	MGSWFNFKEELAVIKFQLEALGGSEAELAFFEWVIADFEDDLQEYKG KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
84	MGSWYMFKEELADIKWYLEALGGSEAELAWFEDDIAGFEWDLQAY KGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
85	MGSWHVFTELADIKFYLEALGGSEAELAMFELWIAEFEHELQDYKG KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
86	MGSWYVFKDELAIEIKQFLEALGGSEAELAWFEDDIAEFETQLQHYKG KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
87	MGSWTEFKGELAEIKWILEALGGSEAELAFFEDEIAAFEWDLQKYKG KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
88	MGSWFWFKEDLAFIKEDLEALGGSEAELAWFEDGIAFFEWDLQDYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
89	MGSWSWFKEDLASIKAVLEALGGSEAELAFFESDIAEFELQYYKG KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
90	MGSWILFKDDLAWIKETLEALGGSEAELAFFEDNIADFEEQLQGYKG KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
91	MGSWQWFKDDLAYIKETLEALGGSEAELALFEDMIADFELQWYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD123	F1
92	MGSWEEFHSRLDAIDRLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESLQAYKG KGNPEVEWLRWEAATIRETLQAYRHN	CD123	F3
93	MGSWSEFWQRLEAIEDRLWALGGSEAELAAFEKEIAAFESLQAYKG KGNPEVEWLRRENAAMIRDELQAYRHN	CD123	F3
94	MGSWTEFAWRLDAIYDRLLALGGSEAELAAFEKEIAAFESLQAYKG KGNPEVEWLRHVAANIRRELQAYRHN	CD123	F3
95	MGSWDEFYYRLEAIEMRLGALGGSEAELAAFEKEIAAFESLQAYKG KGNPEVEELRHYAAQIRHMLQAYRHN	CD123	F3
96	MGSWIEFNMRLDAIYERLVALGGSEAELAAFEKEIAAFESLQAYKG KGNPEVEWLRKVAANIRRELQAYRHN	CD123	F3
97	MGSWSEFNMRLDAIYERLTALGGSEAELAAFEKEIAAFESLQAYKG KGNPEVEWLRHSAARIRRELQAYRHN	CD123	F3
98	MGSWVEFNIRLDAIYERLYALGGSEAELAAFEKEIAAFESLQAYKG KGNPEVEKLRHWAASIRRELQAYRHN	CD123	F3

(continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	Objetivo	Colección
99	MGSWDEFGRRLYAIEWRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEKLREIAAVIRSNLQAYRHN	CD123	F3
100	MGSWIEFYDRLEAIYDRLDALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEWLREDAAFIRSWLQAYRHN	CD123	F3
101	MGSWTEFDRRLDAIWDRLFALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEWLREEAADIRDYLQAYRHN	CD123	F3
102	MGSWTEFDRRLDAIWDRLFALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEWLREEAADIRDYLQAYRHN	CD123	F3
103	MGSWIEFEVRLDAIYNRLAALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVERLRRYAANIRHELQAYRHN	CD123	F3
104	MGSWTEFHDRLEAIDDRWLALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEYLREEAAQIRWELQAYRHN	CD123	F3
105	MGSWYEFHRLDAIYERLLALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEWLRSSAANIRKELQAYRHN	CD123	F3
106	MGSWHEFDQRLWAIEERLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYK GKGNPEVETLRLYAALIRHDLQAYRHN	CD123	F3
107	MGSWIEFESRLWAIEDRLLALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKGK GNPEVEFLRLEAADIREDLQAYRHN	CD123	F3
108	MGSWYEFENRLGAIGDRLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEWLRDEAAYIRAVLQAYRHN	CD123	F3
109	MGSWNEFYDRLSAIYFRLQALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEHLRWYAADIRMILQAYRHN	CD123	F3
110	MGSWYEFYRLEAIEDRLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEYLREEAAWIRVWLQAYRHN	CD123	F3
111	MGSWVEFENRLEAIENRLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEWLREDAAQIRMMLQAYRHN	CD123	F3
112	MGSWYEFWDRLEAIDDRWLALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYK GKGNPEVEALRQEA AWIREELQAYRHN	CD123	F3
113	MGSWFEFWDRLDAIEDRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEELRDEAAWIRGTLQAYRHN	CD123	F3
114	MGSWTEFDRRLDAIWDRLFALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEWLREEAADIRDYLQAYRHN	CD123	F3
115	MGSWWEFEMRLEAIEDRLFALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVESLRWEAAAFIRDILQAYRHN	CD123	F3
116	MGSWVEFYDRLHAIYFRLALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEDLRWYAADIRLVLQAYRHN	CD123	F3
117	MGSWYEFYNRLSAIYARLQALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEDLRWYAADIRYMLQAYRHN	CD123	F3
118	MGSWFEFWGRLEAIESRLKALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEELREHA AWIRAYLQAYRHN	CD123	F3
119	MGSWTEFSIRLEAIYDRLVALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKGK GNPEVEVLRTYAANIRHELQAYRHN	CD123	F3
120	MGSWYEFENRLEAIEERLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEMLREEAAAFIRDWLQAYRHN	CD123	F3
121	MGSWYEFVIRLEAIEDRLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEVLRWYAADIRHELQAYRHN	CD123	F3
122	MGSWIEFEDRLEAIEDRLFALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKGK GNPEVEWLRQEAAEIRLMLQAYRHN	CD123	F3
123	MGSWTEFNRLDAIYDRLMALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEWLRASAAAIRVELQAYRHN	CD123	F3
124	MGSWSEFYLRDLAIYDRLDALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEWLRKTAANIREELQAYRHN	CD123	F3

(continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	Objetivo	Colección
125	MGSWSEFHVRLDAIYARLDALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVERLREWAANIRRELQAYRHN	CD123	F3
126	MGSWHEFGVRLDAIYDRLMALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEFLRQAAANIRSELQAYRHN	CD123	F3
127	MGSWYEFMRLDAIYDRLMALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEQLRGYAAANIRNELQAYRHN	CD123	F3
128	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEKLREIAAVIRSNLQAYRHN	CD123	F3
129	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGEEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEKLREIAAVIRSNLQAYRHN	CD123	F3
130	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123	F3
131	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGEEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEKLREIAAVIRSNLQAYRHN	CD123	F3
132	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEKLREIAAVIRSNLQAYRHN	CD123	F3
133	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGGEAEAAFEKEIAAFESELQAYK GKGNPEVEKLREIAAVIRSNLQAYRHN	CD123	F3
134	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGEEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123	F3
135	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGTEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123	F3
136	MGSWDEFGRRLYAIEWQLYALGGGEAEAAFEKEIAAFESELQAYK GKGNPEVEKLREIAAVIRENLQAYRHN	CD123	F3
137	MGSWEEFELRLNAIEERLYALGGSEAEALAYFEYVIADFEGNLQRYKG KGNPEVEALYFEADAIFEELVAYRHN	CD19	C2
138	MGSWFEFNHRLWAIFERLMALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEYLRAAAMVIRYHLQAYRHN	CD19	F3
139	MGSWEEFDGRLFAIEQRLQALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEVLRWFAAGIRDFLQAYRHN	CD19	F3
140	MGSWAEFYHRLYAIETRLALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEYLRHWAAWIRTYLQAYRHN	CD19	F3
141	MGSWVEFSDRLYAIEERLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEELRELAARHSLQAYRHN	CD19	F3
142	MGSWWEFEGRLYAIEERLTALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEYLREWAAWIRQMLQAYRHN	CD19	F3
143	MGSWWEFEHRLYAIEERLVALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEYLRNWAAYIRMALQAYRHN	CD19	F3
144	MGSWWEFEARLYAIEFRLSALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEYLRSWAAYIRTSLQAYRHN	CD19	F3
145	MGSWWEFEARLWAIESRLKALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEYLRHWAAYIRVILQAYRHN	CD19	F3
146	MGSWWEFEARLYAIEFRLSALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEYLRSWAAYIRTSLQAYRHN	CD19	F3
147	MGSWEEFYHRLDAIELRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEYLRWYAAEIREILQAYRHN	CD19	F3
148	MGSWYEFYERLDAIDTRLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEFLREYAAEIRHFLQAYRHN	CD19	F3
149	MGSWNEFFDRLDAILYRLDALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEYLRFVAADIRSWLQAYRHN	CD19	F3
150	MGSWIEFDDRLLAIMDRLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEDLRDVAADIRHYLQAYRHN	CD19	F3

(continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	Objetivo	Colección
151	MGSWYEFWERLDAITFRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEDLRTWAADIRAILQAYRHN	CD19	F3
152	MGSWEEFYIRLDAIMERLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEDLRYAAADIRHFLQAYRHN	CD19	F3
153	MGSWIEFEERLYAIETRLALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKGK GNPEVEFLRVVAADIREWLQAYRHN	CD19	F3
154	MGSWIEFEHRLSAINDRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKGK GNPEVEDLREWAADIRSLQAYRHN	CD19	F3
155	MGSWFEFEMRLDAIMARLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYK GKGNPEVEDLRYAAADIRDYLQAYRHN	CD19	F3
156	MGSWYEFVYRLDAIYDRLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYK GKGNPEVEDLRYAAADIRDFLQAYRHN	CD19	F3
157	MGSWVEFEDRLDAILERLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEDLRELAADIRDFLQAYRHN	CD19	F3
158	MGSWFEFEERLIAIEERLALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKGK GNPEVEYLRWIAADIRDVLQAYRHN	CD19	F3
159	MGSWIEFADRLDAILDRLDALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEWLREIAADIRAYLQAYRHN	CD19	F3
160	MGSWLEFEYRLDAILDRLFALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEDLREVAADIRMLLQAYRHN	CD19	F3
161	MGSWYEFHDLDAITNRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEDLRDWAADIRVWLQAYRHN	CD19	F3
162	MGSWQFEQRLDAINWRLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYK GKGNPEVEELREWAADIRIFLQAYRHN	CD19	F3
163	MGSWYEFYSRLDAIDSRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEFLRDYAAEIRRYLQAYRHN	CD19	F3
164	MGSWEEFHDRLEAISDRLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEDLRDWAADIRFYLQAYRHN	CD19	F3
165	MGSWWEFDERLYAIEDRLFALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEWLRIVAADIREILQAYRHN	CD19	F3
166	MGSWEEFEYRLMAIEVRLWALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEVLREIAADIRQILQAYRHN	CD19	F3
167	MGSWVVFQRLAYIKDLLEALGGSEAEALAYFEMSIAFFEEDLQVYKG KGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD22	F1
168	MGSWYEFKNDLAWIKVHLEALGGSEAEALAYFEFRIAHFENALQYYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	CD22	F1
169	MGSWVEFYNRLWAIDHRLHALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYK GKGNPEVEVRLRYHAASIRVTLQAYRHN	CD22	F3
170	MGSWSEFYDRLHAIHHRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEALRDTAAFIRTRLQAYRHN	CD22	F3
171	MGSWKEFHFRHLHAIEHRLIALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKGK GNPEVEFLRAKAANIRTHLQAYRHN	CD22	F3
172	MGSWFEFHGRHLHATYGRSLALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEHLRAHAAHIRDHLQAYRHN	CD22	F3
173	MGSWYEFADRLHAIHQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEALRMTAAAFIRSRLQAYRHN	CD22	F3
174	MGSWNEFYNRLHAIHQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVESLRQTAAYIRDRLQAYRHN	CD22	F3
175	MGSWNEFADRLHAIHQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVESLRMTAAAFIRSRLQAYRHN	CD22	F3
176	MGSWTEFSYRLGAIQSRLHALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKG KGNPEVEHLRYNAAKIRHFLQAYRHN	CD22	F3

(continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	Objetivo	Colección
177	MGSWQEFTTRLEAIYHRLRALGGSEAEANFEGFIAEFEGNLQMYKG KGNPEVEALVHEAYAI MEELHAYRHN	DR5	C2
178	MGSWVEFFDRLKAIHDRLEALGGSEAE LAHF EKLI AHFEHRLQNYKG KGNPEVEALEKEADAIL YELAA YRHN	DR5	C2
179	MGSWYYFKHHLAWIKMELEALGGSEAE LAHFESSIASFERDLQYYK GKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1
180	MGSWVEFHRLHAIQYRLYALGGSEAE LAAFEKEIAAFES ELQAYKG KGNPEVEELRHWA AFIRLQLQAYRHN	DR5	F3
181	MGSWNEFHRLNAIHARLHALGGSEAE LAAFEKEIAAFES ELQAYKG KGNPEVENLRDDAA FIRRF LQAYRHN	PD-L1	F3
182	MGSWYEFTVRLEAIHERL KALGGSEAE LAAFEKEIAAFES ELQAYKG KGNPEVEILRDDAA FIRRF LQAYRHN	PD-L1	F3
183	MGSWKEFDDRLNAIKARLQALGGSEAE LAAFEKEIAAFES ELQAYKG KGNPEVEDLRDDAA FIRRF LQAYRHN	PD-L1	F3
184	MGSWYEFDDRLNAIHDRLQALGGSEAE LAAFEKEIAAFES ELQAYKG KGNPEVEDLRDDAA FIRRF LQAYRHN	PD-L1	F3
185	MGSWNEFKNRLDAIHKRLNALGGSEAE LAAFEKEIAAFES ELQAYKG KGNPEVENLRDDAA FIRHFLQAYRHN	PD-L1	F3
186	MGSWTEFEQRLEAIHNRLQALGGSEAE LAAFEKEIAAFES ELQAYKG KGNPEVEELRNDAA FIRHFLQAYRHN	PD-L1	F3

En otros ejemplos, la invención comprende una o más de las secuencias con 60-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 95-99% de homología (e intervalos imbricados en los mismos) con aquella secuencias identificadas en la Tabla 1. En varias modalidades, las secuencias que tienen esta homología son funcionalmente similares o idénticas en comparación con la secuencia respectiva identificada en la Tabla 1. En varios ejemplos, el ejemplo comprende uno o más polipéptidos que compiten por (completa o parcialmente) una o más de las secuencias identificadas en la Tabla 1 por su objetivo respectivo. En varios ejemplos, la competencia se puede evaluar por medio de un ensayo de competencia estándar. En algunos ejemplos, la competencia no requiere que el polipéptido contrario compita por el mismo objetivo específico que aquellos polipéptidos de la Tabla 1, más bien pueden competir por la unión a un epítipo estéricamente inhibidor, un epítipo imbricado, etcétera.

Maduración por Afinidad de DBDpp

Las estrategias de maduración por afinidad se pueden utilizar para generar DBDpp de alta afinidad que se pueden utilizar en las proteínas de fusión de DBDpp descritas en este documento.

Las colecciones de mutagénesis se pueden crear y examinar para optimizar adicionalmente la secuencia de las mejores sustancias aglutinantes. Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:401-24 (1997).

Un DBDpp mejorado que se une específicamente a un objetivo deseado también se puede preparar con base en una secuencia de DBDpp conocida. Por ejemplo, por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más mutaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservadoras o no conservadoras), supresiones o inserciones se pueden introducir en una secuencia de DBDpp conocida y los DBDpp resultantes se pueden examinar por la unión al objetivo deseado y la actividad biológica, tal como la capacidad para antagonizar la actividad biológica del objetivo o agonizar la actividad biológica del objetivo.

Artículos de Manufactura

Los artículos de manufactura, que incluyen equipos, también se proporcionan en este documento. El artículo de manufactura puede comprender un recipiente y una etiqueta o prospecto de envase sobre o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos o jeringas. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente retiene uno o más DBDpp, ácidos nucleicos que codifican DBDpp y/o vectores o células hospedantes de la presente descripción. La etiqueta o prospecto de envase puede incluir instrucciones para realizar el examen, detección y/o purificación basados en la afinidad.

También se proporcionan equipos que contienen un DBDpp. Estos equipos tienen usos que incluyen, pero no están limitados a la detección o aislamiento del objetivo de interés al cual se une específicamente el DBDpp. Este equipo de ensayo puede ser útil en el examen por la presencia de un objetivo de interés y/o la cuantificación de las concentraciones de un objetivo de interés en un fluido, tal como un fluido biológico (por ejemplo, sangre, suero o fluido

sinovial).

En una modalidad se contempla un equipo de ensayo de DBDpp el cual comprende uno o más recipientes de un DBDpp que se une específicamente a un objetivo de interés y, opcionalmente, un medio de detección para determinar la presencia o ausencia de una interacción de objetivo/DBDpp o la ausencia de la misma. El equipo contiene opcionalmente además un objetivo de interés de proteína que se puede utilizar, por ejemplo como un control o estándar. El DBDpp puede estar libre o puede ser expresado sobre la superficie de una célula hospedante o sobre la superficie de un bacteriófago. En una modalidad específica, el DBDpp o el objetivo de interés proporcionados en el equipo son etiquetados. Se puede utilizar cualquier etiqueta conocida en el campo. En algunas modalidades, la etiqueta se selecciona del grupo que consiste de biotina, un fluorógeno, una enzima, un epítipo, un cromógeno o un radionúclido. En algunos ejemplos, el DBDpp se inmoviliza sobre un soporte sólido. El medio de detección empleado para detectar la etiqueta dependerá de la naturaleza de la etiqueta y puede ser cualquiera medio conocido en el campo, por ejemplo, una película para detectar un radionúclido; un sustrato de enzimas que da origen a o amplifica una señal detectable para detectar la presencia de un objetivo de interés.

Un equipo descrito comprende además un soporte sólido para el DBDpp, el cual se puede proporcionar como un elemento separado o sobre el cual se inmoviliza un DBDpp que se une específicamente a un objetivo de interés. Por lo tanto, el DBDpp que se une específicamente al objetivo de interés en el equipo puede ser inmovilizado sobre un soporte sólido, o pueden ser inmovilizados en este soporte que está incluido con el equipo o es proporcionado por separado del equipo. Preferiblemente, el DBDpp es revestido sobre una placa de microtitulación. En algunos ejemplos, la detección involucra una molécula amplificadora de señal. Donde la molécula amplificadora de señal es una enzima, el equipo incluye opcionalmente además sustratos y cofactores requeridos por la enzima y donde la molécula amplificadora es un fluoróforo. El equipo incluye opcionalmente además un precursor de tinte que proporciona el cromóforo detectable.

El equipo también puede contener instrucciones para llevar a cabo el ensayo, así como también otros aditivos tales como estabilizadores, amortiguadores de lavado e incubación, y similares. Los componentes del equipo serán proporcionados en relaciones predeterminadas, con las cantidades relativas de los diversos reactivos variadas adecuadamente para proporcionar las concentraciones en solución de los reactivos que maximizan substancialmente la sensibilidad del ensayo y/o la capacidad para purificar el objetivo de interés. Particularmente, los reactivos se pueden proporcionar como polvos secos, usualmente liofilizados, que incluyen excipientes, los cuales en disolución proporcionarán una solución reactiva que tiene la concentración apropiada para la combinación con la muestra a ser sometida a prueba.

Varios formatos y técnicas para ensayos de unión que se pueden utilizar son conocidos en el campo e incluyen pero no están limitados a, inmovilización a filtros, tales como nilón o nitrocelulosa; matrices bidimensionales, ensayo inmunoabsorbente vinculado con enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayos de unión competitiva, ensayos de emparedado directo e indirecto, ensayos de inmunoprecipitación, tecnología de ensayo de microvolumen fluorimétrico (FMATM), ensayos de sistema Luminex^{MR}, transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET), transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET), electroinmunoensayos, AlphaScreen^{MR}, técnicas derivadas de nanopartículas y resonancia de plasmón superficial (SPR).

Los ensayos de unión pueden ser homogéneos o semi-homogéneos. Un ensayo homogéneo es un ensayo donde todos los componentes se mezclan conjuntamente, se incuban y luego se analizan. Un ensayo semi-homogéneo es uno donde la mayoría de la reacción tiene lugar como una mezcla compleja, pero se requiere un paso de lavado antes de la adición de un reactivo final y el análisis, en contraste con un ensayo de emparedado de ensamblaje gradual típico donde cada componente se agrega luego se lava completamente antes de que se agregue el siguiente componente. En algunas modalidades, el ensayo es un inmunoensayo. En ciertas modalidades el ensayo es un inmuno-ensayo de enzimas semi-homogéneo (EIA),

Aplicaciones

Los DBDpp, ya sea solos, como proteínas de fusión, como conjugados químicos o como otras modalidades descritas en este documento, tienen una variedad de aplicaciones. En algunas modalidades, los DBDpp se utilizan como reactivos de detección, reactivos de captura, reactivos de separación, reactivos de diagnóstico o reactivos analíticos. Algunas modalidades tienen aplicaciones in vivo, in vitro y/o ex vivo. Los métodos que emplean el DBDpp in vitro se pueden realizar en diferentes formatos, tal como en placas de microtitulación, en matrices de proteínas, en superficies biosensoras, en secciones de tejido y en formatos adicionales que serían aparentes para una persona experta en el campo. Del mismo modo, los métodos que emplean los DBDpp in vivo se pueden utilizar en diferentes formatos que incluyen pero no están limitados a proteínas de fusión de DBDpp-Fc, células de CAR y anticuerpos multi-específicos para DBDpp. En modalidades particulares los DBDpp tales como proteínas de fusión de DBDpp se utilizan como un agente terapéutico.

Aplicaciones Analíticas y de Diagnóstico

Ya sea solos, como proteínas de fusión, como conjugados químicos o como otras modalidades descritas en este

documento, los DBDpp tienen una variedad de aplicaciones. En algunas modalidades, los DBDpp se utilizan como reactivos de detección de objetivo de interés en una variedad de diferentes tipos de muestras.

En una modalidad, un DBDpp se utiliza para detectar objetivos de interés en soluciones involucradas en procesos de manufactura, tales como la expresión y purificación de proteínas. Las muestras pueden incluir, pero no están limitadas a, agua, amortiguadores, muestras de purificación en proceso, sustancia farmacológica a granel y producto farmacológico final. En modalidades aún adicionales, los DBDpp se pueden utilizar para detectar y/o retirar impurezas o contaminantes de una muestra, tal como una fuente de suministro de agua o agua (u otro fluido) utilizada en la manufactura.

En otra modalidad, los DBDpp se utilizan para detectar objetivos de interés en muestras de diagnóstico. Las muestras pueden incluir, pero no están limitadas a homogenizados de tejido, extractos de células, muestras de biopsia, sueros, plasma, linfa, sangre, fracciones de sangre, orina, fluido sinovial, fluido espinal, saliva, moco, esputo, fluido pleural, aspirados de pezones, fluido del tracto respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, leche materna, fluido del sistema linfático, semen, fluido cerebroespinal, fluido del sistema de órganos internos, fluido ascítico, fluido de quistes tumorales, líquido amniótico y medios o lisado de células cultivadas.

En una modalidad, los DBDpp son útiles para detectar la presencia de un factor o múltiples factores (por ejemplo, antígenos u organismos) en una muestra biológica. El término "detectar" como se utiliza en este documento comprende la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas modalidades, una muestra biológica comprende una célula, tejido o fluido. En ciertas modalidades, estos tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos.

Varios formatos y técnicas para la detección son conocidos en el campo e incluyen pero no están limitados al análisis de inmunotransferencia Western, inmunohistoquímica, ELISA, análisis FACS, ensayos enzimáticos, autorradiografía y cualquiera de los ensayos de unión mencionados en este documento.

En un ejemplo descrito, se proporciona un método para detectar un objetivo de interés en una solución que contiene el objetivo que comprende: (a) poner en contacto la solución con un DBDpp que se une específicamente al objetivo de interés bajo condiciones adecuadas para la unión específica del DBDpp al objetivo y (b) detectar la unión del DBDpp y el objetivo. El DBDpp puede estar ya sea libre o inmovilizado. Se concede suficiente tiempo para permitir la unión entre el objetivo de interés y el DBDpp, y los componentes sin unión en la solución o mezclas son retirados o deslavados. La formación de un complejo de unión entre el DBDpp y el objetivo de interés entonces se puede detectar, por ejemplo, al detectar la señal de una etiqueta en el DBDpp, la cual es un componente del complejo de unión. Una etiqueta puede ser cualquier etiqueta que genera una señal que pueda ser detectada por medio de métodos estándar, tal como una etiqueta fluorescente, un compuesto radiactivo o una enzima que reacciona con un sustrato para generar una señal detectable. Los ejemplos de etiquetas adecuados para estos propósitos se describen en este documento y/o son conocidos de otra manera en el campo.

Los DBDpp que se unen a un objetivo de interés pueden ser etiquetados de manera detectable a través del uso de radioisótopos, etiquetas de afinidad (tales como biotina, avidina, etcétera), etiquetas enzimáticas (tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etcétera) utilizando métodos conocidos en el campo, tal como se describe en el documento WO 00/70023 y (Harlow y Lane (1989) Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory, páginas 1-726).

El marcador o etiqueta detectable puede ser cualquiera que tenga la capacidad de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal medible, tal como una señal radioactiva, cromogénica, luminiscencia o fluorescente, la cual se puede utilizar para cuantificar la cantidad de porción o etiqueta detectable unida en una muestra. Las etiquetas detectables que son conocidas en el campo incluyen radioisótopos, tales como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I , etiquetas electroquimioluminiscentes (tal como un catalizador basado en rutenio (Ru) en conjunción con sustratos, etcétera), etiquetas luminiscentes o bioluminiscentes (por ejemplo, europio, vanadio), compuestos fluorescentes o quimioluminiscentes, tales como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina, enzimas (por ejemplo, enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante), etiquetas colorimétricas tales como oro coloidal, vidrio coloreado o cuentas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etcétera), átomos paramagnéticos o agentes magnéticos, reactivos electrodensos, una nanocuenta o micro-cuenta que contiene un tinte fluorescente, nanocristales, un punto cuántico, una cuenta cuántica, una nanomarca, dendrímeros con una etiqueta fluorescente, un micro-transpondedor, una molécula donadora de electrones o estructura molecular, o una partícula reflectante de luz, las micropartículas pueden ser nanocristales o puntos cuánticos. Los nanocristales son sustancias que absorben fotones de luz, luego emiten de nuevo fotones en una longitud de onda diferente (fluoróforos). Además, las etiquetas fluorescentes adicionales, o anticuerpos secundarios se pueden conjugar con los nanocristales. Los nanocristales están disponibles comercialmente de fuentes tales como Invitrogen y Evident Technologies (Troy, N.Y.). Otras etiquetas incluyen E)-5-[2-(metoxicarbonil)etenil]citidina, la cual es una molécula no fluorescente que cuando se sujeta a irradiación de luz ultravioleta (UV) genera un producto, 3-beta-D-ribofuranosil-2,7-dioxipirido[2,3-d]pirimidina, la cual exhibe una señal fluorescente fuerte.

La inhibición competitiva se puede determinar por cualquier método conocido en el campo, por ejemplo, ensayos ELISA de competencia. Un DBDpp, tal como una proteína de fusión de DBDpp (por ejemplo, un DBDpp-Fc, un DBDpp-

CAR, un DBDpp-scFv) u otra molécula se dice que "inhibe de manera competitiva" la unión de una molécula de referencia a un epítipo determinado si se une a ese epítipo al grado que bloquea, a algún grado, la unión de la molécula de referencia al epítipo. Como se utiliza en este documento, un DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp), u otra molécula se puede decir que inhibe de manera competitiva la unión de la molécula de referencia a un epítipo determinado, por ejemplo, por al menos 90%, al menos 80%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50%, al menos 40%, al menos 30% o al menos 20%. Los términos "compiten", "capacidad para competir" y "compite con" son términos relativos utilizados para describir un DBDpp, tal como una proteína de fusión de DBDpp, que produce por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40% o por lo menos 50% de inhibición de la unión de una molécula de referencia a un objetivo por un DBDpp tal como una proteína de fusión de DBDpp (por ejemplo, un DBDpp-Fc, un DBDpp CAR, un DBDpp-scFv y un anticuerpo que comprende un DBDpp) determinada en un ensayo de competencia estándar como se describe en este documento o como se conoce de otra manera en el campo, que incluyen, pero no están limitados a, sistemas de ensayos competitivos que utilizan técnicas tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos de enzimas (EIA), preferiblemente el ensayo inmunoabsorbente vinculado con enzimas (ELISA), inmunoensayos de "emparedado", ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, ensayos luminiscentes, luminiscentes electroquímicos y de inmunoelectroforesis. Los métodos para determinar la unión y afinidad de moléculas de unión candidatas son conocidos en el campo e incluyen, pero no están limitados a, la cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión de tamaño, diálisis de equilibrio, desplazamiento de sondas fluorescentes y resonancia del plasma.

Purificación por Afinidad

En la purificación basada en la cromatografía de afinidad, las proteínas objetivo se aíslan selectivamente de acuerdo con su capacidad para unirse específica y reversiblemente a un ligando que típicamente ha sido acoplado de manera covalente a una matriz cromatográfica. En una modalidad, los DBDpp se pueden utilizar como reactivos para la purificación por afinidad de objetivos de interés de ya sea fuentes recombinantes o fuentes naturales tales como muestras biológicas (por ejemplo, suero).

En otro ejemplo descrito, se proporciona un método para aislar un objetivo de interés de una solución que contiene el objetivo de interés. Este método comprende: (a) poner en contacto la solución con un DBDpp bajo condiciones que permiten la unión del DBDpp al objetivo de interés; y (b) recuperar el objetivo de interés. En otra modalidad, se proporciona un método para aislar un objetivo de interés de una solución que contiene el objetivo de interés, que comprende: (a) poner en contacto la solución con un DBDpp bajo condiciones que son adecuadas para la unión específica del DBDpp al objetivo; y (b) separar el(los) complejo(s) formado(s) por el objetivo de interés y/o el DBDpp de otros componentes de la solución. En una modalidad adicional, el método comprende además los pasos de: (c) disociación del DBDpp del objetivo de interés, y (d) recuperación del objetivo de interés disociado.

En algunos ejemplos, el DBDpp que se une específicamente a un objetivo de interés es inmovilizado sobre cuentas y luego utilizado para purificar por afinidad la proteína objetivo.

Los métodos de acoplamiento covalente de proteínas a una superficie son conocidos por aquellas personas de experiencia en el campo, y las marcas de péptidos que se pueden utilizar para adherir un DBDpp a una superficie sólida son conocidas para aquellas personas de experiencia en el campo. Además, el DBDpp se puede adherir (es decir, acoplar, vincular o pegar) a una superficie sólida utilizando cualquier reactivo o técnica conocido en el campo. En algunas modalidades, el soporte sólido se selecciona de: cuentas, vidrio, portaobjetos, chips y gelatina. De esta manera, se puede utilizar una serie de DBDpp para hacer una matriz sobre una superficie sólida utilizando técnicas conocidas en el campo. Por ejemplo, la Publicación de los Estados Unidos No. 2004/0009530 da a conocer métodos para la preparar matrices.

En otro ejemplo, un DBDpp se utiliza para aislar un objetivo de interés por medio de la cromatografía de afinidad. Se puede emplear cualquier método convencional de cromatografía. En algunas modalidades, un DBDpp se inmoviliza sobre un soporte sólido. El DBDpp se puede inmovilizar sobre el soporte sólido utilizando técnicas y reactivos descritos en este documento o conocidos de otra manera en el campo. Los soportes sólidos adecuados que se describen en este documento son conocidos de otra manera en el campo y en modalidades específicas son adecuados para empacar una columna de cromatografía. El DBDpp inmovilizado entonces puede ser cargado o puesto en contacto con una solución bajo condiciones favorables para formar un complejo entre el DBDpp y el objetivo de interés. Los materiales sin unión pueden ser deslavados. Las condiciones de lavado adecuadas pueden ser determinadas fácilmente por una persona de experiencia en el campo. Los ejemplos de condiciones de lavado adecuadas incluyen pero no están limitados a PBS/0,01% de Tween 20^{MR}, pH 7,2 y NaCl 1 M/Tris 10 mM, pH 7,5. Los amortiguadores de lavado de Tris pueden ser preferibles puesto que los fosfatos pueden precipitarse en etilenglicol al 50%. En términos generales no limitantes, los amortiguadores de lavado están a pH 7,0, que contienen opcionalmente NaCl de 0,0 a 1,5 M, más preferiblemente NaCl 1 M. Adicionalmente, los amortiguadores de lavado pueden contener opcionalmente un detergente suave, tal como Tween 20^{MR}, Tween 80^{MR} o NP-80. El objetivo de interés puede ser eluido del complejo de unión de DBDpp al introducir condiciones de solución que favorecen la disociación del complejo de unión. Las soluciones de elución adecuadas pueden ser determinadas fácilmente por una persona de experiencia en el campo e incluyen pero no están limitadas a 50% de etilenglicol/NaOAc 10 mM. A manera de ejemplo no limitante, los amortiguadores de elución útiles contienen 40-60% de etilenglicol, preferiblemente 50% de etilenglicol; y NaOAc 50-

100 mM con un pH en el intervalo de pH 4-7, más preferiblemente pH 4-6 y mucho más preferiblemente pH 4,5-5,5. Preferiblemente, una técnica cromatográfica de afinidad de flujo rápido se utiliza para unir el DBDpp al objetivo de interés y del cual se eluye el objetivo de interés purificado.

Alternativamente, la cromatografía se puede llevar a cabo al mezclar una solución que contiene el objetivo de interés y el DBDpp, luego aislar complejos del objetivo de interés y DBDpp. Para este tipo de separación, muchos métodos son conocidos y se pueden aplicar de manera rutinaria. Por ejemplo, el DBDpp se puede inmovilizar sobre un soporte sólido tal como cuentas, luego se puede separar de una solución junto con el objetivo de interés por medio de la filtración. En otro ejemplo, el DBDpp puede ser una proteína de fusión que contiene una marca de péptido, tal como una cola de poli-HIS o una región de unión de estreptavidina, la cual se puede utilizar para aislar el DBDpp después de que los complejos se han formado utilizando una resina cromatográfica de afinidad por metales inmovilizada o un sustrato revestido con estreptavidina. Una vez separado, el objetivo de interés puede ser liberado del DBDpp bajo condiciones de elución y puede ser recuperado en forma purificada.

Composiciones Terapéuticas

Los DBD descritos en este documento son útiles en una variedad de aplicaciones que incluyen pero no están limitadas a, métodos de tratamiento terapéutico, los cuales pueden ser métodos in vitro, ex vivo o in vivo.

La aplicación como una entidad terapéutica es un atributo de la especificidad de unión a un objetivo del DBDpp. La incorporación del DBDpp dentro de varias composiciones moleculares, (por ejemplo, fusiones de DBD-anticuerpo, conjugados de DBD-fármaco y DBD-receptores quiméricos) facilitan la aplicación en una variedad de indicaciones y modalidades terapéuticas, las cuales incluyen, pero no están limitadas a composiciones solubles y asociadas con células.

En una modalidad, el DBDpp es una proteína de fusión soluble (mostrada esquemáticamente en la FIGURA 5C y constituida de una marca de epítipo opcional 10 y un dominio de fijación como objetivo 20) que se une a un objetivo que está asociado con una enfermedad o trastorno del sistema metabólico, cardiovascular, musculoesquelético, neurológico o esquelético. En otras modalidades, el DBDpp es una proteína de fusión soluble que se une a un objetivo que está asociado con una infección o enfermedad de levadura, hongos, virus o bacterias. En algunas modalidades, el DBDpp es una proteína de fusión soluble que se une a un objetivo que está asociado con una enfermedad o trastorno del sistema inmune.

También se proporcionan composiciones terapéuticas que son útiles para practicar métodos terapéuticos que se describen en este documento. En una modalidad, las composiciones terapéuticas proporcionadas en este documento contienen un portador fisiológicamente tolerable junto con por lo menos una especie de fusión de DBDpp como se describe en este documento, disueltos o dispersados en las mismas como un ingrediente activo. En otra modalidad, las composiciones terapéuticas proporcionadas en este documento contienen un portador fisiológicamente tolerable junto con por lo menos una especie de un DBDpp como se describe en este documento, disueltos o dispersados en las mismas como un ingrediente activo. En una modalidad preferida, la composición terapéutica no es inmunógena cuando se administra a un paciente humano para fines terapéuticos.

La preparación de una composición farmacológica que contiene ingredientes activos disueltos o dispersados en la misma es bien entendida en el campo. Típicamente estas composiciones se preparan como composiciones inyectables estériles ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, acuosas o no acuosas. Sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas que son adecuadas para la solución, o suspensiones, en un líquido antes del uso. La preparación también se puede emulsionar. De esta manera, una composición que contiene DBDpp puede tomar la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, cápsulas, formulaciones o polvos de liberación sostenida, u otras formas de composición. En algunas modalidades, las composiciones de DBDpp (por ejemplo, proteínas de fusión de DBDpp) se formulan para asegurar u optimizar la distribución in vivo. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés) excluye muchos compuestos sumamente hidrófilos y si así se desea, las composiciones se preparan con el fin de incrementar la transferencia a través de la BBB, por ejemplo por medio de la formulación en liposomas. Para métodos de manufactura de liposomas, véase por ejemplo las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.522.811, 5.374.548 y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que son transportadas selectivamente dentro de células u órganos específicos, para mejorar de esta manera el suministro de fármacos dirigidos (véase, por ejemplo, Ranade, Clin. Pharmacol. 29:685 (1989)).

El DBDpp (por ejemplo proteína de fusión de DBDpp) se puede mezclar con otros ingredientes activos y/o excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo y en cantidades adecuadas para el uso en métodos terapéuticos descritos en este documento. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes de humedecimiento o emulsionantes, agentes amortiguadores de pH y similares los cuales mejoran la efectividad del ingrediente activo.

Los DBDpp terapéuticos pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes en los mismos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con grupos amino libres del

polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaina y similares.

Los portadores fisiológicamente tolerables son conocidos en el campo. Los portadores líquidos ejemplares son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los ingredientes activos y agua, o contienen un amortiguador tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, tal como solución salina amortiguada con fosfato. Aún además, los portadores acuosos pueden contener más de una sal amortiguadora, así como también sales tales como cloruros de sodio y potasio, dextrosa, propilenglicol, polietilenglicol y otros solutos.

Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y exceptuando el agua. Estas fases líquidas adicionales ejemplares son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón, ésteres orgánicos tales como oleato de etilo y emulsiones de agua-aceite.

En una modalidad, una composición terapéutica contiene una proteína de fusión de DBDpp, típicamente en una cantidad de por lo menos 0,1 por ciento en peso de proteína de fusión de DBDpp por peso de la composición terapéutica total. Un porcentaje en peso es una relación en peso de la fusión de DBDpp por la composición total. De esta manera, por ejemplo, 0,1 por ciento en peso es 0,1 gramos de DBDpp por 100 gramos de composición total.

Una composición terapéutica que contiene proteína de fusión de DBDpp contiene típicamente de aproximadamente 10 microgramos (μg) por mililitro (ml) a aproximadamente 100 miligramos (mg) por ml de proteína de fusión de DBDpp como ingrediente activo por volumen de composición, y más preferiblemente contiene de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml (es decir, de aproximadamente 0,1 a 1 por ciento en peso).

Los intervalos de dosificación para la administración del DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) son aquellos suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el cual los síntomas de la enfermedad mediados por la molécula objetivo son mejorados. La dosificación no debe ser tan grande que cause efectos colaterales adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, condición, sexo y grado de la enfermedad en el paciente y puede ser determinada por una persona experta en el campo. La dosificación puede ser ajustada por el médico individual en caso de alguna complicación.

El DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) se puede administrar por la vía parenteral por medio de una inyección o por medio de una infusión gradual a través del tiempo. Aunque la molécula objetivo puede ser introducida típicamente en el cuerpo por medio de la administración sistémica y por lo tanto debe ser tratado por medio de la administración intravenosa de composiciones terapéuticas, se contemplan otros tejidos y medios de suministro donde existe la probabilidad de que el tejido fijado como objetivo contenga la molécula objetivo. De esta manera, el DBDpp se puede administrar por la vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavitaria, transdérmica y se puede suministrar por un medio peristáltico. Las proteínas de fusión de DBDpp también se pueden suministrar por medio de aerosol a las vías respiratorias y los pulmones.

Las composiciones terapéuticas que contienen un DBDpp se pueden administrar convencionalmente por vía intravenosa, como por medio de una inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. El término "dosis unitaria" cuando se utiliza con referencia a una composición terapéutica proporcionada en este documento se refiere a unidades físicamente discretas que son adecuadas como una dosificación unitaria para el sujeto, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido; por ejemplo, un portador o un vehículo. En una modalidad específica, las composiciones terapéuticas que contienen un DBDpp se administran por vía subcutánea.

En algunas modalidades, el DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) se administra de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La cantidad que es administrada depende del sujeto que es tratado, la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el ingrediente activo, y el grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas de ingrediente activo requeridas para ser administradas dependen del juicio del practicante y son particulares para cada individuo. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para la aplicación sistémica se dan a conocer en este documento y dependen de la ruta de administración. Los regímenes adecuados para administración también son variables, pero se caracterizan por una administración inicial seguida por dosis repetidas en intervalos de una o más horas por una inyección subsecuente u otra administración. Alternativamente, se contempla la infusión intravenosa continua que es suficiente para mantener concentraciones en la sangre en los intervalos especificados para terapias in vivo.

Las composiciones de DBDpp se formulan, se dosifican y se administran de una forma consistente con la buena práctica médica. Los factores para la consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que es tratado, el mamífero particular que es tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos para los

practicantes médicos. Los intervalos de dosificación para la administración del DBDpp son aquellos suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el cual se mejoran los síntomas de la enfermedad mediados por la molécula objetivo. La dosificación no debe ser tan grande que cause efectos colaterales adversos, tales como, síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, condición, sexo y grado de la enfermedad en el paciente y puede ser determinada por una persona de experiencia en el campo. La dosificación puede ser ajustada por el médico individual en caso de alguna complicación.

El programa de dosificación y las cantidades efectivas para usos terapéuticos y profilácticos, es decir, el "régimen de dosificación" dependerán de una variedad de factores, que incluyen la causa, etapa y gravedad del trastorno o enfermedad, la salud, estado físico, edad del mamífero que es tratado y el sitio y modo del suministro del DBD. La eficacia terapéutica y la toxicidad del complejo y la formación se pueden determinar por medio de procedimientos farmacéuticos, farmacológicos y toxicológicos estándar en cultivos de células o animales experimentales. Los datos obtenidos a partir de esos procedimientos se pueden utilizar del mismo modo en la formulación de una gama de dosificaciones para el uso en humanos. Por otra parte, el índice terapéutico (es decir, la dosis terapéuticamente efectiva en 50 por ciento de la población dividido por la dosis letal para 50 por ciento de la población (ED50/LD50)) se puede determinar fácilmente utilizando procedimientos conocidos. La dosificación está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones que incluye la DE50 con poca toxicidad o sin toxicidad, y puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la ruta de administración.

El régimen de dosificación también toma en consideración parámetros farmacocinéticos que son conocidos en el campo, tales como velocidad de absorción de fármaco, biodisponibilidad, metabolismo y aclaramiento (véase, por ejemplo, Hidalgo-Aragones, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58:611-617 (1996); Groning y colaboradores, Pharmazie 51:337-341 (1996); Fotherby, Contraception 54:59-69 (1996); y Johnson y colaboradores, J. Pharm. Sci. 84:1144-1146 (1995)). Está dentro del estado de la técnica para que el especialista clínico determine el régimen de dosificación para cada sujeto que es tratado. Por otra parte, se pueden proporcionar administraciones individuales o múltiples de composiciones de DBDpp dependiendo de la dosificación y la frecuencia como sea requerido y tolerado por el sujeto. La duración del tratamiento profiláctico y terapéutico variará dependiendo de la enfermedad o condición particular que es tratada. Algunas enfermedades son factibles para el tratamiento agudo mientras que otras requieren una terapia crónica a largo plazo. Los DBDpp se pueden administrar en serie, o simultáneamente con el agente terapéutico adicional.

En algunas modalidades, el DBDpp se administra de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg.

En otra modalidad, un DBDpp se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de un DBDpp, tal como una proteína de fusión de DBDpp, puede ser una cantidad tal que cuando se administre en una composición fisiológicamente tolerable es suficiente para lograr una concentración en plasma de aproximadamente 0,1 microgramo (μ g) por mililitro (ml) a aproximadamente 100 μ g/ml, preferiblemente de aproximadamente 1 μ g/ml a aproximadamente 5 μ g/ml, y usualmente de aproximadamente 5 μ g/ml. Dicho de otra manera, la dosificación puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días.

En una modalidad, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno del sistema inmune, tal como una enfermedad inflamatoria o autoinmune.

En algunas modalidades, el DBDpp es una proteína soluble que se une específicamente a un objetivo que está asociado con una enfermedad o trastorno del sistema metabólico, cardiovascular, musculoesquelético, neurológico o esquelético.

En otras modalidades, el DBDpp es una proteína soluble que se une específicamente a un objetivo que está asociado con una infección o enfermedad por levadura, hongos, virus o bacterias. En algunas modalidades, el DBDpp es una proteína soluble que se une específicamente a un objetivo que está asociado con una enfermedad o trastorno del sistema inmune.

En una modalidad, las proteínas de fusión de DBDpp son útiles para inhibir el crecimiento de tumores, reducir la neovascularización, reducir la angiogénesis, inducir la diferenciación, reducir el volumen de tumores y/o reducir la tumorigenicidad de un tumor.

En algunas modalidades, los DBDpp descritos en este documento son útiles para tratar el cáncer. De esta manera, algunos métodos descritos para tratar el cáncer comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de

un DBDpp (por ejemplo, una fusión de DBDpp) a un paciente.

Los cánceres que pueden ser tratados incluyen tumores que no son vascularizados, o todavía no son vascularizados sustancialmente, así como también tumores vascularizados. Los cánceres pueden comprender tumores no sólidos (tales como tumores hematológicos, por ejemplo, leucemias y linfomas) o pueden comprender tumores sólidos. Los tipos de cánceres que son tratados con los DBDpp incluyen, pero no están limitados a, carcinoma, blastoma y sarcoma, y ciertas malignidades de leucemia o linfoides, tumores benignos y malignos, y malignidades por ejemplo sarcomas, carcinomas y melanomas. Los tumores/cánceres en adultos y tumores/cánceres pediátricos también están incluidos.

Los ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma y otros sarcomas, tumor sinovial, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, malignidad linfóide, cáncer pancreático, cáncer de mama, cánceres pulmonares, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del CNS (tal como un glioma (tal como glioma del tronco encefálico y gliomas mezclados), glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme) astrocitoma, linfoma del SNC, germinoma, blastoma medular, Schwannoma craneofaringeoma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma del nervio acústico, oligodendroglioma, menangioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis en el cerebro).

En otra modalidad, los DBDpp descritos en este documento son útiles para tratar a un paciente que tiene cánceres hematológicos. Los ejemplos de cánceres hematológicos (o hematógenos) incluyen leucemias, que incluyen leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblastos, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tal como leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkiniano (formas indolores y de grado alto), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia.

En modalidades adicionales, la proteína de fusión de DBDpp se une a (1) un objetivo en una célula o tejido de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral en una célula de tumor) y (2) un objetivo en una célula efectora, tal como una molécula receptora de células T. De acuerdo con una modalidad, la unión de uno o más objetivos por la proteína de fusión de DBDpp se utiliza para dirigir una respuesta inmune a un agente infeccioso, célula, tejido u otra ubicación de interés en un paciente. Por ejemplo, en algunas modalidades un DBDpp se une específicamente a un objetivo sobre la superficie de una célula efectora. De esta manera, en algunas modalidades, un DBDpp se une específicamente a un objetivo sobre la superficie de una célula T. En modalidades específicas un DBDpp se une específicamente a CD3. En otras modalidades, un DBDpp se une específicamente a CD2. En una modalidad adicional, un DBDpp se une específicamente al receptor de células T (TCR). De acuerdo con modalidades adicionales, un DBDpp se une específicamente a un objetivo sobre la superficie de una célula Asesina Natural. De esta manera, en algunas modalidades, un DBDpp se une específicamente a un receptor de NKG2D (Grupo Asesino Natural 2D). En modalidades adicionales un DBDpp se une específicamente a CD16 (es decir, Fc gamma RIII) CD64 (es decir, Fc gamma RI) o CD32 (es decir, Fc gamma RII).

En una modalidad, una proteína de fusión de DBDpp se une a un objetivo en un leucocito y un antígeno tumoral en una célula de tumor. En algunas modalidades, la proteína de fusión de DBDpp se une a NKG2D. En una modalidad adicional, una proteína de fusión de DBDpp se une a NKG2D y un objetivo seleccionado de ErbB2, EGFR, IGF1R, CD19, CD20, CD80 y EpCAM. En una modalidad, una proteína de fusión de DBDpp se une a CD3. En modalidades particulares, el DBDpp se une específicamente a CD3 épsilon. En una modalidad, una proteína de fusión de DBDpp se une a CD4.

En una modalidad, la fusión de DBDpp es biespecífica y se une específicamente a dos objetivos diferentes expresadas sobre la superficie de dos tipos diferentes de células. En una modalidad la proteína de fusión de DBDpp biespecífica se une específicamente a un objetivo de célula cancerosa y un objetivo de célula efectora inmune. En una modalidad la proteína de fusión de DBDpp biespecífica se une específicamente a un objetivo expresado en una célula cancerosa (por ejemplo, CD19) y un objetivo expresado en la superficie de un linfocito T (por ejemplo, CD3).

En algunas modalidades, un DBDpp puede imitar la unión a ligandos. En ciertas modalidades, un DBDpp puede imitar la actividad biológica de un ligando (un DBDpp agonista) o puede inhibir la bioactividad del ligando (un DBDpp antagonista), por ejemplo, a través de la unión competitiva. Un DBDpp en proteínas de fusión de DBDpp también puede afectar objetivos de otras maneras, por ejemplo, al neutralizar, bloquear, estabilizar, agregar o reticular un objetivo de DBDpp.

Conjugados de DBDpp-Fármaco

En una modalidad adicional una proteína de fusión de DBDpp se puede vincular con otras moléculas o sustratos orgánicos o inorgánicos a través del uso de la conjugación de manera química. En una modalidad, los conjugados de DBDpp-fármaco se proponen para facilitar el suministro local de agentes citotóxicos a través de la especificidad de fijación como objetivos del DBDpp. Esta combinación de especificidad de fijación como objetivos y agente citotóxico permite el suministro dirigido del fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de esos agentes farmacológicos no conjugados puede dar por resultado niveles inaceptables de toxicidad para células normales así como también las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin y colaboradores, Lancet páginas 603-05 (1986); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera y colaboradores (eds.), páginas 475-506) (1985)).

Los agentes citotóxicos incluyen agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), isótopos radiactivos (es decir, un radioconjugado), etcétera. Los agentes quimioterapéuticos que son útiles en la generación de estos inmunoconjugados incluyen, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes intercaladores. Los agentes quimioterapéuticos que son útiles en la generación de estos inmunoconjugados también incluyen fármacos antitubulina, tales como auristatinas, que incluyen monometil-auristatina E (MMAE) y monometil-auristatina F (MMAF). Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar de acuerdo con la invención incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos sin unión de toxina de difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En una modalidad, un DBDpp (por ejemplo, una proteína de fusión de DBDpp) se conjuga con un radioisótopo. En una modalidad adicional, un DBDpp se conjuga con un isótopo seleccionado de ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re y ^{188}Re utilizando cualquiera de una variedad de queladores conocidos o etiquetado directo. En otras modalidades, el DBDpp se acopla a fármacos, profármacos o linfocinas tal como interferón. Los conjugados del DBDpp y citotoxina se pueden hacer rutinariamente utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tal como bis-(p-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolieno) y compuestos de fluoruro bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). En una modalidad específica, la toxina se conjuga con una proteína de fusión de DBDpp a través de un sistema conector escindible con enzimas (por ejemplo, tal como aquel presente en SGN-35). También se pueden utilizar conjugados de un DBDpp y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tal como una caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno, y CC1065, y los derivados de esas toxinas que tienen actividad tóxica.

En algunas modalidades, el agente citotóxico se adhiere covalentemente a un DBDpp por medio de un conector. En algunas modalidades, el conector que adhiere el DBDpp y el agente citotóxico es escindible por una proteasa.

Uso Terapéutico como Receptor Asociado con Células

En una modalidad de la invención, los DBDpp-CAR se utilizan con fines de redireccionamiento de células T transducidas a un objetivo de tumor definido por la especificidad de unión de los DBDpp-CAR. En un ejemplo las células T primarias son transducidas con un vector lentiviral que codifica un CAR que combina un dominio de unión de objetivo de DBD con un dominio transmembrana y un dominio intracelular de CD3-zeta, CD28, 4-1BB. La población resultante de células T transducidas puede provocar por lo tanto una respuesta de células T mediada por DBDpp-CAR. En una modalidad las células T son modificadas genéticamente para expresar los DBDpp-CAR y la célula T DBDpp-CAR se infunde a un paciente necesitado de la misma. La célula infundida tiene la capacidad de eliminar células tumorales en el receptor. Varias modalidades de la invención son particularmente ventajosas debido a que incluyen uno, varios o la totalidad de los siguientes beneficios: (i) especificidad de unión a un objetivo, (ii) eficacia terapéutica mejorada, (iii) efectos colaterales sin fijación de objetivo reducidos, (iv) capacidad de ajuste para marcadores de un paciente particular o población de pacientes, (v) estabilidad mejorada durante la producción y el procesamiento y (vi) capacidad de fijar como objetivo uno, dos o más objetivos específicos para mejorar la terapia dirigida a un objetivo.

Las "células modificadas genéticamente", "células redirigidas", "células diseñadas genéticamente" o "células modificadas" como se utilizan en este documento se refieren a células que expresan un DBDpp proporcionado en este documento. En una modalidad particular, las células modificadas genéticamente expresan una proteína de fusión de DBDpp tal como un DBDpp-CAR. En una modalidad adicional, las células modificadas genéticamente expresan y exhiben un DBDpp-CAR sobre la superficie celular.

La "enfermedad fijada como objetivo por células modificadas genéticamente" como se utiliza en este documento comprende la fijación como objetivo de cualquier célula involucrada de cualquier manera en alguna enfermedad por las células modificadas genéticamente, independientemente si las células modificadas genéticamente fijan como objetivo células enfermas o células saludables para efectuar un resultado benéfico terapéuticamente. Las células

5 modificadas genéticamente incluyen pero no están limitadas a células T modificadas genéticamente, células NK, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias pluripotentes o células madre embrionarias. Las células modificadas genéticamente expresan el DBDpp-CAR, el cual puede fijar como objetivo cualquiera de los antígenos expresados sobre la superficie de células objetivo.

10 En una modalidad, la porción de DBDpp del DBDpp-CAR se diseña para tratar un cáncer particular. Los cánceres que pueden ser tratados incluyen tumores que no son vascularizados, o todavía no vascularizados sustancialmente, así como también tumores vascularizados. Los cánceres pueden comprender tumores no sólidos (tales como tumores hematológicos, por ejemplo, leucemias y linfomas) o pueden comprender tumores sólidos. Los tipos de cánceres que son tratados con los DBDpp-CARs incluyen, pero no están limitados a, carcinoma, blastoma y sarcoma, y cierta

15 malignidades de leucemia o linfoides, tumores benignos y malignos, y malignidades por ejemplo sarcomas, carcinomas y melanomas. Los tumores/cánceres en adultos y tumores/cánceres pediátricos también están incluidos.

Los ejemplos de cánceres hematológicos (o hematógeno) incluyen leucemias, que incluyen leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblastos, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tal como leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkiniano (formas indoloras y de grado alto), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, síndrome mielodisplástico, leucemia de células

20 pilosas y mielodisplasia.

Los ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma y otros sarcomas, tumor sinovial, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, malignidad linfóide, cáncer pancreático, cáncer de mama, cánceres pulmonares, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del CNS (tales como un glioma (tal como glioma del tronco encefálico y gliomas mezclados), glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme) astrocitoma, linfoma del SNC, germinoma, blastoma medular, Schwannoma craneofaringeoma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma del nervio acústico, oligodendroglioma, menangioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis en el

40 En una modalidad, los cánceres y trastornos pueden ser tratados utilizando una célula que expresa el DBDpp-CAR que fija como objetivo el CD19, CD20, CD22 y ROR1. En una modalidad específica, el DBD-CAR se puede diseñar para fijar como objetivo el CD22 para tratar el linfoma de células B. En otra modalidad la célula que expresa el DBDpp-CAR que contiene un DBDpp diseñado para fijar como objetivo el CD19 se puede utilizar para tratar cánceres y trastornos que incluyen pero no están limitados a ALL pre-B (indicación pediátrica), ALL en adultos, linfoma de células del manto, linfoma de células B grandes difusas, trasplante de médula ósea pos-allogénico salvaje y similares.

Las "enfermedades asociadas con células B" como se utiliza en este documento incluyen inmunodeficiencias de células B, enfermedades autoinmunes y/o proliferación excesiva/descontrolada de células asociada con células B (que incluye linfomas y/o leucemias). Los ejemplos de estas enfermedades, en donde el DBDpp-CAR se puede utilizar para planteamientos terapéuticos incluyen pero no están limitados a lupus eritematoso sistémico (SLE), diabetes, artritis reumatoide (RA), artritis reactiva, esclerosis múltiple (MS), pénfigo vulgar, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerativa, enfermedad tiroidea autoinmune, agammaglobulinemia vinculada con X, leucemia linfoblástica aguda pre-b, lupus eritematoso sistémico, inmunodeficiencia variable común, leucemia linfocítica crónica, enfermedades asociadas con la deficiencia selectiva de IgA y/o deficiencia de la subclase

55 IgG, linfomas de linaje B (linfoma de Hodgkin y/o linfoma no Hodgkiniano), inmunodeficiencia con timoma, hipogammaglobulinemia transitoria y/o síndrome hiper-IgM, así como también enfermedades de células B mediadas por virus tal como enfermedad linfoproliferativa mediada por EBV e infecciones crónicas en las cuales las células B participan en la patofisiología.

60 En una modalidad, el DBDpp-CAR se puede diseñar para fijar como objetivo la mesotelina para tratar el mesotelioma, cáncer pancreático, cáncer ovárico y similares. En una modalidad, el DBDpp-CAR se puede diseñar para fijar como objetivo el CD33/IL3Ra para tratar la leucemia mielógena aguda y similares. En una modalidad, el DBDpp-CAR se puede diseñar para fijar como objetivo el c-Met para tratar el cáncer de mama negativo triple, cáncer pulmonar de células no pequeñas, y similares. En una modalidad, el DBDpp-CAR se puede diseñar para fijar como objetivo el PSMA para tratar el cáncer de próstata y similares. En una modalidad, el DBDpp-CAR se puede diseñar para fijar como objetivo el Glicolípidio F77 para tratar el cáncer de próstata y similares. En una modalidad, el DBDpp-CAR se

puede diseñar para fijar como objetivo el EGFRvIII para tratar el glioblastoma y similares. En una modalidad, el DBDpp-CAR se puede diseñar para fijar como objetivo el GD-2 para tratar el neuroblastoma, melanoma, y similares. En una modalidad, el DBDpp-CAR se puede diseñar para fijar como objetivo el NY-ESO-1 para tratar el mieloma, sarcoma, melanoma y similares. En una modalidad, el DBDpp-CAR se puede diseñar para fijar como objetivo el MAGE A3 para tratar el mieloma, sarcoma, melanoma y similares. Se debe interpretar que la invención incluye cualquier objetivo antigénico que esté asociado con una enfermedad donde un DBDpp-CAR como se define en las reivindicaciones se puede utilizar para tratar la enfermedad.

En un ejemplo descrito, el DBDpp-CAR se expresa en una célula T y proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer, que comprende la administración de células hospedantes que expresan el DBDpp-CAR para tratar a un paciente con cáncer en el cual la célula cancerosa expresa un antígeno tumoral sobre su superficie, y en donde el DBDpp se une específicamente al antígeno objetivo. Los antígenos objetivo ejemplares a los cuales el DBDpp y el DBDpp-CAR se unen incluyen, pero no están limitados a, CD19, CD123, TSLPR y CD267.

Las células T modificadas con DBDpp-CAR también pueden servir como un tipo de vacuna para la inmunización ex vivo y/o la terapia in vivo en un mamífero. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Las células T modificadas con DBDpp-CAR proporcionadas en este documento se pueden administrar ya sea solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como agentes quimioterapéuticos, anticuerpos, citocinas o poblaciones de células. Las composiciones proporcionadas en este documento se formulan preferiblemente para la administración intravenosa la cual se puede proporcionar una o más veces.

"Variantes de escape de pérdida de antígenos" como se utiliza en este documento se refiere a células las cuales exhiben una expresión reducida o pérdida de expresión del antígeno objetivo, antígenos los cuales son fijados como objetivo por un CAR proporcionado en este documento.

Varias modalidades de la invención ahora serán ilustradas a través de la descripción de experimentos conducidos de acuerdo con las mismas. Los ejemplos que siguen se proporcionan para facilitar la práctica de las modalidades dadas a conocer y de ninguna manera se deben interpretar como limitantes del resto de la descripción. En los ejemplos, se hace referencia a las figuras anexas.

Ejemplos

Ejemplo 1. Evaluación de inmunogenicidad de DBDpp

Las secuencias de DBDpp, particularmente aquellas administradas a un sujeto y/o utilizadas en la purificación de una composición administrada a un sujeto, son preferiblemente no antigénicas con respecto al sujeto (por ejemplo, ser humano). En algunas modalidades, la secuencia del DBDpp no contiene un motivo de unión de HLA-DR de humano o sitios de escisión para proteasomas e inmuno-proteasomas. En modalidades particulares, la secuencia de DBDpp no contiene una secuencia antigénica como se determina por una versión de un modelo de predicción por computadora existente en la fecha de presentación de esta especificación. En modalidades particulares, la secuencia de DBDpp no contiene una secuencia de sitio de unión de MHC (clase I o clase II) como se predice por un algoritmo seleccionado de ProPred (véase, por ejemplo, Singh, Bioinformatics 17(12):1236-1237 (2001)), ProPred1 (Singh, Bioinformatics 19(8):1009-14 (2003)), SYFPEITHI (véase, por ejemplo, Schuler, Immunoinf. Meth. en Mol. Biol. 409(1):75-93 (2007)), SMM-align (véase, por ejemplo, Nielsen, BMC Bioinformatics 8:238 (2007)), RANKPEP (véase, por ejemplo, Reche, Hum Immunol. 63:701-709 (2004)), o TEPIPOPE (véase, Sturniolo, Nat Biotechnol 17:555-561 (1999)), en donde la versión del algoritmo y la base de datos aplicada existen en la fecha de presentación de esta solicitud.

El análisis in silico de la secuencia de aminoácidos de alpha3D (MGSWAEFKQRLAAIKTRLQALGGSEAEALAAFEK EIAAFESELQAYKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRH N (SEQ ID NO:49) reveló una secuencia de 9 aminoácidos (es decir, LAAIKTRLQ (SEQ ID NO:50)), que comparte características con aquella de epítomos de células T de alta afinidad (umbral de unión menor que 6%) y promiscuos (presentes en más de 50% de los alelos relevantes) (Singh, Bioinformatics 17:1236-1237, 2001). Este epítipo reside dentro de una región invariante de algunas de las colecciones de DBDpp. Por lo tanto, con el objetivo de reducir el potencial de inmunogenicidad, una sustitución Q19E se introdujo en la SEQ ID NO:49. Pareció improbable que esta sustitución conservada y expuesta en la superficie alterara significativamente el núcleo hidrófobo (véase, por ejemplo, la FIGURA 1B). El análisis in silico de la secuencia resultante (SEQ ID NO:1) produjo valores de inmunogenicidad más bajos.

Ejemplo 2. Diseño, Construcción y Examen de Colecciones de DBDpp

A diferencia de los ligandos naturales y proteínas de unión, la secuencia de andamiaje sintética de DBD (es decir, SEQ ID NO:1) no tiene un asociado de unión conocido. En la construcción del DBDpp que se une a objetivos, los residuos se consideraron para la mutación (es decir, aleatorización dentro de la colección) si se consideró que estaban expuestos en la superficie - que exhibían accesibilidad para solventes significativa. Está disponible una variedad de métodos para evaluar la accesibilidad para solventes de estructuras moleculares definidas. Por ejemplo, PyMOL es

un paquete de software de fuente abierta desarrollado para la visualización molecular y el análisis y se puede utilizar para calcular el área superficial accesible para solventes utilizando el método de Lee y Richards (Lee y colaboradores, J. Mol. Biol. 55:379-400 (1971)). Más específicamente, utilizando PyMOL (versión 1.4.1) con el "solvente de punto" ajustado a 1, el "radio de solvente" a 1,4 Å y "densidad de punto" ajustada a 4, el área superficial accesible para solventes se puede calcular para cada aminoácido de un modelo de homología de la SEQ ID NO: 1 con base en la plantilla, PDB 2A3D. La Tabla 2 lista el área calculada (en angstroms cuadrados) para cada residuo, medida en el contexto del dominio (área D) y como un aminoácido aislado, independiente de impedimentos estéricos impuestos por residuos adyacentes (área I). La accesibilidad relativa de un residuo dentro del dominio (área D) en comparación con el área aislada (área I) se representa como un valor de porcentaje (% de A).

Tabla 2. Accesibilidad para Solventes de la Secuencia de Andamiaje de Referencia (SEQ ID NO: 1)

posición	aa	Área I	Área D	% de A	posición	aa	Área I	Área D	% de A
1	M	295,0	156,9	53,2	38	F	316,3	12,6	4,0
2	G	187,1	56,6	30,2	39	E	289,6	112,0	38,7
3	S	227,0	23,6	10,4	40	S	227,0	93,7	41,3
4	W	345,8	107,4	31,1	41	E	285,0	57,9	20,3
5	A	211,9	53,7	25,4	42	L	281,8	21,5	7,6
6	E	286,8	104,7	36,5	43	Q	294,3	120,5	41,0
7	F	318,1	7,8	2,5	44	A	209,6	79,0	37,7
8	K	303,7	142,0	46,8	45	Y	323,7	33,1	10,2
9	Q	293,7	123,0	41,9	46	K	303,8	70,1	23,1
10	R	341,2	102,9	30,2	47	G	187,2	64,4	34,4
11	L	274,1	19,0	6,9	48	K	298,8	149,1	49,9
12	A	211,5	54,8	25,9	49	G	185,6	6,9	3,7
13	A	211,3	43,4	20,6	50	N	267,4	80,5	30,1
14	I	279,0	18,0	6,5	51	P	238,9	92,8	38,8
15	K	300,5	134,3	44,7	52	E	293,1	110,3	37,6
16	T	246,5	89,7	36,4	53	V	249,2	5,7	2,3
17	R	339,6	131,8	38,8	54	E	290,7	91,0	31,3
18	L	279,6	27,8	9,9	55	A	211,2	67,2	31,8
19	E	269,3	135,1	50,2	56	L	274,5	10,5	3,8
20	A	211,6	61,6	29,1	57	R	336,4	146,8	43,6
21	L	278,0	8,9	3,2	58	K	306,7	165,1	53,8
22	G	186,9	67,8	36,3	59	E	290,1	114,0	39,3
23	G	186,6	47,9	25,7	60	A	211,1	13,2	6,3
24	S	225,9	12,2	5,4	61	A	211,7	47,6	22,5
25	E	286,9	130,2	45,4	62	A	211,0	56,7	26,9
26	A	210,5	92,4	43,9	63	I	275,2	26,3	9,5
27	E	281,6	57,7	20,5	64	R	337,5	119,5	35,4
28	L	269,8	4,4	1,6	65	D	261,1	106,5	40,8
29	A	211,4	53,0	25,1	66	E	284,7	102,5	36,0
30	A	210,7	54,2	25,7	67	L	272,8	7,3	2,7
31	F	317,0	14,8	4,7	68	Q	277,9	131,3	47,2
32	E	284,7	96,0	33,7	69	A	211,4	40,4	19,1
33	K	306,8	158,8	51,8	70	Y	329,3	50,8	15,4
34	E	281,1	83,1	29,5	71	R	341,0	149,1	43,7
35	I	276,3	22,9	8,3	72	H	279,1	135,5	48,5
36	A	211,4	58,5	27,7	73	N	275,1	130,5	47,4
37	A	209,8	51,4	24,5					

Los residuos de dominios con valores de % de A que son menores que 10% a 11% (por ejemplo, F7, L11, I14, L18, L21, S24, L28, F31, I35, F38, L42, Y45, G49, V53, L56, A60, I63 y L67 de la SEQ ID NO:1; Tabla 2A), se consideró que eran relativamente inaccesibles para el solvente exterior y por lo tanto se consideraron residuos de núcleo interiores del DBD. Por el contrario, los residuos con valores de % de A que fueron mayores que 10% a 11% (por ejemplo, G2, S3, W4, A5, E6, K8, Q9, R10, A12, A13, K15, T16, R17, E19, A20, A29, A30, E32, K33, E34, A36, A37, E39, S40, E41, Q43, A44, E52, E54, A55, R57, K58, E59, A61, A62, R64, D65, E66, Q68, A69 e Y70 de la SEQ ID NO:1) se predice que están ubicados dentro de regiones del polipéptido asociadas con la estructura secundaria alfa-hélica y que ocupan posiciones que tienen mayor potencial para la interacción con objetivos de interés macromoleculares. Estos residuos alfa-hélicos accesibles para solventes se consideró que eran candidatos para el grado más grande de densidad de sustitución (que incluye sustituciones conservadas y no conservadas) en la colección.

Los residuos que no son alfa-hélicos de la secuencia de andamiaje de referencia corresponden a, en varias modalidades, las posiciones M1, L21, G22, G23, S24, E25, A26, E27, Y45, K46, G47, K48, G49, N50, P51, R71, H72 y N73 de la SEQ ID NO:1. En modalidades adicionales, los residuos que no son alfa-hélicos de la secuencia de andamiaje de referencia corresponden a las posiciones M1, G22, G23, S24, E25, A26, E27, K46, G47, K48, G49, N50,

P51, R71, H72 y N73 de la SEQ ID NO:1. Del mismo modo se consideró que estos residuos eran candidatos para las sustituciones conservadas y no conservadas en la colección.

Algunas colecciones de DBDpp se crearon a través de la mutación selectiva o aleatoria de posiciones de secuencia de aminoácidos expuestas a solventes específicas del DBDpp. En una serie de experimentos, las colecciones, referidas en este documento como colecciones de "cara" o "colecciones F", se diseñaron de tal manera que los residuos sustituidos de la estructura de andamiaje de referencia del polipéptido de la SEQ ID NO:1 fueran agrupados en una cara individual del dominio y crearan una superficie de unión contigua, individual. Las colecciones de cara se construyeron para tres caras (F1, F2 y F3) de la estructura del polipéptido de la SEQ ID NO:1. Debido a la asimetría de la estructura de dominio, cada par de alfa-hélices - y por lo tanto cada cara - forma una topología geométrica única (FIGURAS 1 y 2). Como se modeló en el andamiaje de referencia, los residuos fijados como objetivo de números grandes corresponden al área superficial contigua mayor que 1400 angstroms cuadrados - significativamente mayor que las superficies de unión medidas para un sondeo de andamiajes de unión que no son de anticuerpos. (Gilbreth y colaboradores, Curr. Opin. Struct. Biol. 22:413-420 (2012)).

En otro conjunto de experimentos, las colecciones referidas en este documento como colecciones "combinadas" o "colecciones C" se construyeron para identificar DBDpp que exhiben potencialmente unión de múltiples facetas a un objetivo de interés (Tabla 3 y FIGURAS 1 y 2). Las colecciones combinadas (C1 y C2) se construyeron al combinar residuos de cada una de las tres hélices utilizadas en las colecciones serie F.

En esos experimentos, un total de 32 posiciones de residuos se sujetaron a la mutagénesis. Cada posición mutagenizada está presente en por lo menos 2 colecciones. Adicionalmente, cada posición mutagenizada es representada en cada una de las dos "estructuras" de colecciones; F y C.

Tabla 3. Perfiles de Secuencias de Colecciones de DBDpp

Colección	Perfil de secuencia
F1	MGSWX ₅ X ₆ FKX ₉ X ₁₀ LAX ₁₃ IKX ₁₆ X ₁₇ LEALGGSEAEALAX ₃₀ FEX ₃₃ X ₃₄ IAX ₃₇ FEX ₄₀ X ₄₁ LQX ₄₄ YKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2)
F2	MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAEALAFX ₃₂ X ₃₃ EIX ₃₆ AFX ₃₉ X ₄₀ ELX ₄₃ AYKGKGNPEVEALX ₅₇ X ₅₈ EAX ₆₁ AIX ₆₄ X ₆₅ ELX ₆₈ AYRHN (SEQ ID NO:3)
F3	MGSWX ₅ EFX ₈ X ₉ RLX ₁₂ AIX ₁₅ X ₁₆ RLX ₁₉ ALGGSEAEALAAFEKEIAAFESSELQAYKKGKGNPEVEX ₅₅ LRX ₅₈ X ₅₉ AAX ₆₂ IRX ₆₅ X ₆₆ LQAYRHN (SEQ ID NO:4)
C1	MGSWX ₅ X ₆ FKX ₉ X ₁₀ LAX ₁₃ IKX ₁₆ X ₁₇ LEALGGSEAEALAFX ₃₂ X ₃₃ EIX ₃₆ AFX ₃₉ X ₄₀ ELX ₄₃ AYKGKGNPEVEX ₅₅ LRX ₅₈ X ₅₉ AAX ₆₂ IRX ₆₅ X ₆₆ LQAYRHN (SEQ ID NO:5)
C2	MGSWX ₅ EFX ₈ X ₉ RLX ₁₂ AIX ₁₅ X ₁₆ RLX ₁₉ ALGGSEAEALAX ₃₀ FEX ₃₃ X ₃₄ IAX ₃₇ FEX ₄₀ X ₄₁ LQX ₄₄ YKGKGNPEVEALX ₅₇ X ₅₈ EAX ₆₁ AIX ₆₄ X ₆₅ ELX ₆₈ AYRHN (SEQ ID NO:6)
FILpx	MGSWX ₅ X ₆ FKX ₉ X ₁₀ LAX ₁₃ IKX ₁₆ X ₁₇ LEALZ ₁ EAELAX ₂₈ FEX ₃₁ X ₃₂ IAX ₃₅ FEX ₃₈ X ₃₉ LQX ₄₂ YZ ₂ NPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:7)
F2Lpx	MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ ₁ EAELAFX ₃₀ X ₃₁ EIX ₃₄ AFX ₃₇ X ₃₈ ELX ₄₁ AYZ ₂ NPEVEALX ₅₂ X ₅₃ EAX ₅₆ AIX ₅₉ X ₆₀ ELX ₆₃ AYRHN (SEQ ID NO:8)
F3Lpx	MGSWX ₅ EFX ₈ X ₉ RLX ₁₂ AIX ₁₅ X ₁₆ RLX ₁₉ ALZ ₁ EAELAAFEKEIAAFESSELQAYZ ₂ NPEVEX ₅₀ LRX ₅₃ X ₅₄ AAX ₅₇ IRX ₆₀ X ₆₁ LQAYRHN (SEQ ID NO:9)
CILpx	MGSWX ₅ X ₆ FKX ₉ X ₁₀ LAX ₁₃ IKX ₁₆ X ₁₇ LEALZ ₁ EAELAFX ₃₀ X ₃₁ EIX ₃₄ AFX ₃₇ X ₃₈ ELX ₄₁ AYZ ₂ NPEVEX ₅₀ LRX ₅₃ X ₅₄ AAX ₅₇ IRX ₆₀ X ₆₁ LQAYRHN (SEQ ID NO:10)
C2Lpx	MGSWX ₅ EFX ₈ X ₉ RLX ₁₂ AIX ₁₅ X ₁₆ RLX ₁₉ ALZ ₁ EAELAX ₂₈ FEX ₃₁ X ₃₂ IAX ₃₅ FEX ₃₈ X ₃₉ LQX ₄₂ YZ ₂ X ₅₂ X ₅₃ EAX ₅₆ AIX ₅₉ X ₆₀ ELX ₆₃ AYRHN (SEQ ID NO:11)
X = todos los residuos de aminoácidos	
Z = secuencia de aminoácidos que corresponde a bucle1 (Z1) o bucle2 (Z2) como se describe en este documento	

Construcción de Colecciones de DBDpp F2NNK

Se construyó una colección F2 que fijó como objetivo 12 residuos expuestos en la superficie en la cara 2 (hélices 2 y 3) (Tabla 3 y FIGURAS 2C y 2D). Esta colección, designada F2NNK, se creó a través de la mutagénesis de Kunkel, utilizando oligonucleótidos que contienen codones NNK. Las colecciones se construyeron utilizando un vector de fagémidos pComb modificado en el cual los DBDpp se fusionan en la terminal C a la terminal N de M13 pIII. Estos DBDpp también se fusionan en su terminal N a la terminal C de la marca de epítipo FLAG. La proteína de fusión de DBDpp completa está bajo el control secretor de un péptido de señal DsbA (FIGURA 3B).

Construcción de Colecciones de Trinucleótido Fosforamidita de DBDpp

Las colecciones subsecuentes se construyeron a través de la mutagénesis de Kunkel en el mismo vector de fagémicos pComb modificado como la colección F2NNK. En varias modalidades, la marca FLAG es opcional (véase por ejemplo, FIGURA 3C) o puede ser reemplazada por otra marca. Estas colecciones se construyeron utilizando mezclas de trinucleótido fosforamidita (codón). Estas mezclas se diseñaron para excluir codones de terminación, cisteína y prolina y proporcionaron una representación igual de los aminoácidos restantes. Las colecciones se construyeron utilizando los cinco perfiles de secuencia (F1, F2, F3, C1 y C2) mostrados en la Tabla 3.

Selección Utilizando la Colección F2NNK

La colección de DBD F2NNK se utilizó en cinco rondas de selección contra el 4-1BB/TNFRSF9/CD137-Fc de humano, biotinilado, recombinante. El examen mediante ELISA del fago rescatado reveló que 89 de 95 clones unieron el 4-1BB/CD137 con una OD promedio 5,3 veces más grande que el control (IgG Fc). La distribución de la unión (valores de absorbancia de ELISA) para los 89 clones: CD137 0,353 (0,134-0,617), control 0,067 (0,056 - 0,125). La secuenciación de un fago individual indicó que la totalidad de 89 clones fueron idénticos al nivel de nucleótidos. Notablemente, este clon, llamado bb10, contenía sustituciones en solo 8 (en negrita en la secuencia posterior) de las 12 posiciones aleatorizadas de la secuencia SEQ ID NO:1 que están subrayadas en la secuencia:

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFLGEIWAFEMELAAAYKGKGNP

EVEALGREAAIRMELQAYRHN (bb10: SEQ ID NO:19).

Selección Utilizando Colecciones de Trinucleótido Fosforamidita F1, F2, F3, C1 y C2

Las selecciones también se realizaron utilizando colecciones de trinucleótido fosforamidita F1, F2, F3, C1 y C2. En la mayoría de los casos, las colecciones se reunieron antes del uso en la selección. Al combinar volúmenes iguales de las colecciones individuales, la Reserva F (colecciones F1, F2 y F3) y la Reserva C (colecciones C1 y C2) se generaron. Estas colecciones se utilizaron en selecciones para sustancias aglutinantes de DBDpp para 4-1BB/CD137 así como también un panel más grande de proteínas "objetivo"-Fc recombinantes purificadas, que incluían CD47, CTLA4, DR5, KIR, LAG3, OX40, PD1, PD-L1 y TIM3. (Muchos de estos objetivos se consideran factores inmuno-reguladores (Pardoll y colaboradores, Nat. Rev. Cancer 12:252-264 (2012)). Después de la incubación del objetivo con las reservas de colecciones de fagos de DBDpp, los complejos de fago-objetivo unidos se capturaron y se separaron de los fagos no unidos con cuentas de proteína A (las proteínas objetivo fueron fusiones de Fc). Después de tres rondas de selección, los clones de fagos rescatados se examinaron por medio de ELISA por la unión al objetivo seleccionado.

Para cada objetivo, aproximadamente 90 clones de fagos de DBDpp se examinaron por medio de ELISA por la unión a la proteína objetivo y así como también un control no específico (por ejemplo, IgG1-Fc). La secuenciación se realizó en clones de DBDpp individuales que exhibieron una señal de unión específica para un objetivo que fue 3 veces más alta que el control no específico. En algunos casos, para la placa de examen de ELISA en la cual la mayoría de los clones de DBDpp fueron positivos, la placa completa se secuenció. Los resultados de las secuencias indicaron que, en total, aproximadamente 70% de los clones de DBDpp estuvieron en el marco de lectura correcto y estuvieron de acuerdo con uno de los cinco perfiles anticipados de secuencias de colecciones (Tabla 3). Las secuencias que no estuvieron de acuerdo con un perfil esperado estuvieron compuestas típicamente de ya sea lecturas de secuenciación fallidas, mutaciones con alteración de pauta de lectura, truncamientos, concatemerizaciones u otros artefactos de clonación.

Los DBDpp se Unen a una Variedad de Objetivos

La Tabla 4 muestra la distribución de clones para cada una de las colecciones como una función de los datos de objetivos y unión. Las tres sub-tablas calculan la distribución para todas las secuencias (superior) y aquellas con relaciones de unión específica para un objetivo iguales a o mayores que 2 (intermedia) o 3 (fondo). (Donde las secuencias son representadas por más de un clon, se utiliza el valor de unión promedio). De las 794 secuencias totales, 330 son clones únicos, de los cuales 278 produjeron una señal de ELISA 3 veces superior al fondo.

Tabla 4. Distribución de Clones de DBDpp y Secuencias Únicas

Todas las secuencias																							
Todos los objetivos				CD137		CD47		CTLA4		DR5		KIR		LAG3		OX40		PD1		PDL1		TIM3	
Colección	Total	Único		Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único
F1	182	78	1	1	1	1	1			74	26	5	3	3	3			51	30			47	14
F2	7	7												5	5	2	2						
F3	416	223	114	49	55	34	34	74	2	2	1	17	16	3	3			53	41	76	63	22	14
C1	4	4			1	1	1					1	1			2	2						
C2	95	17	3	2	73	12	12			14	2	5	1										
F2NNK	90	1	90	1																			
Secuencias con relaciones de ELISA mayores o iguales a 2																							
Total	794	330	208	53	130	48	48	74	2	90	29	28	21	11	11	4	4	104	71	76	63	69	28
ELISA ratio >=2				CD137		CD47		CTLA*4		DR5		KIR		LAG3		OX40		PD1		PDL1		TIM3	
Colección	Total	Único		Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único
F1	162	64	1	1	1	1	1			74	26	5	3	2	2			43	24			36	7
F2	7	7												5	5	2	2						
F3	402	209	114	49	52	31	31	74	2	2	1	15	14	3	3			52	40	75	62	15	7
C1	3	3										1	1			2	2						
C2	92	14	3	2	70	9	9			14	2	5	1										
F2NNK	90	1	90	1																			
Total	756	298	208	53	123	41	41	74	2	90	29	26	19	10	10	4	4	95	64	75	62	51	14

(continuación)

Secuencias con relaciones de ELISA mayores o iguales a 3																							
ELISA ratio >=3				CD137		CD47		CTLA4		DR5		KIR		LAVG3		OX40		PD1		PDL1		TIM3	
Colección	Total	Único		Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único	Total	Único
F1	159	61		1	1			74	26	5	3	2	2			42	23			35	6		
F2	5	5										4	4	1	1								
F3	310	195	114	49	51	30		2	1	14	13	3	3			49	38	66	55	11	6		
C1	2	2								1	1			1	1								
C2	92	14	3	2	70	9		14	2	5	1												
F2NNK	90	1	90	1																			
Total	658	278	207	52	122	40		90	29	25	18	9	9	2	2	91	61	66	55	46	12		

5 La Tabla 5 lista secuencias ejemplares derivadas de los experimentos descritos anteriormente. Para cada secuencia, se indica el objetivo, colección de origen (Lib.), número de apariciones de examen (Recuento) y relación de objetivo con respecto a fondo (relación de ELISA). En varias modalidades, los DBDpp con por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 92%, por lo menos 95% o por lo menos 98% de homología con aquellos descritos anteriormente (y en alguna otra parte en este documento) retienen una equivalencia funcional significativa. En varias modalidades, esto es ventajoso ya que la divergencia en la homología puede presentar ciertas ventajas, tales como inmunogenicidad reducida, reactividad cruzada incrementada, especificidad incrementada, etcétera.

Tabla 5: Secuencias de Clones de Colecciones de DBDpp Aislados de las Colecciones Examinadas

SEQ ID NO:	Secuencia	Objetivo	Lib.	Recuento	Relación de ELISA
12	MGSWVEFGHRLWAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFES ELQAYKGKGNPEVEKLRQAAAFIRFRLQAYRHN	CD137	F3	3	20,606
13	MGSWVEFANRLWAIDQRLFALGGSEAEAAFEKEIAAFESE LQAYKGKGNPEVEHLRDQAAAFIRHKLQAYRHN	CD137	F3	7	16,055
14	MGSWYEFNRHRLWAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFES ELQAYKGKGNPEVEGLREAAAFIRAKLQAYRHN	CD137	F3	4	12,974
15	MGSWYEFMRRLWAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFES ELQAYKGKGNPEVEALRAKAAAYIRWKLQAYRHN	CD137	F3	2	12,040
16	MGSWYEFNRHRLWAINERLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESE LQAYKGKGNPEVERLSMAAFIRYKQLQAYRHN	CD137	F3	4	11,925
17	MGSWYEFHRLWAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFES ELQAYKGKGNPEVEYLRETAHHIRTRLQAYRHN	CD137	F3	3	7,707
18	MGSWYEFHYRLHAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESE LQAYKGKGNPEVEELRIKAAAFIRDLQAYRHN	CD137	F3	3	7,262
19	MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAEAAFLGEIWAFAEME LAAYKG KGNPEVEALGR E AAAI R M E LQ AYRH N	CD137	F2	90	5,269
20	MGSWYEFDLRLHAIYDRLVALGGSEAEAAFEKEIAAFESE LQAYKGKGNPEVEILRDNAAYIRQMLQAYRHN	CD47	F3	2	14,087
21	MGSWTEFTYRLSAIEWRLWALGGSEAEALWFEQKIAFFED FLQYYKGKGNPEVEALKHEAGAILNELMAYRHN	CD47	C2	24	12,517
22	MGSWAEFDHRLHAIRERLHALGGSEAEAAFEKEIAAFESE LQAYKGKGNPEVEILRGNAAYIRALLQAYRHN	CD47	F3	3	11,651
23	MGSWTEFVGRLLAAIEFRLWALGGSEAEALWFEAHIAFFED YLQWYKGKGNPEVEALREEAGAIMHEELKAYRHN	CD47	C2	3	8,230

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Objetivo	Lib.	Recuento	Relación de ELISA
24	MGSWTEFYSRLEAIWVRLQALGGSEAEALAMFEDRIAHFEW FLQYKGGKGNPEVEALHEEAIRKELAAAYRHN	CD47	C2	37	4,578
25	MGSWHEFHDLQAIHERLYALGGSEAEALAAFEKEIAAFESE LQAYKGGKGNPEVESLRIAAAHIRQVLQAYRHN	CTLA4	F3	73	2,950
26	MGSWNYFKDHLAWIKNSLEALGGSEAEALAHFETAIASFER QLQEYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1	12	12,993
27	MGSWLYFKEHLAHIKAWLEALGGSEAEALAHFELAIADFEYH LQEYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1	5	12,309
28	MGSWYFKEHLAWIKTELEALGGSEAEALAHFEHSIADFEMS LQFYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1	4	12,117
29	MGSWFYFKQHLAWIKSYLEALGGSEAEALAHFERAIAAFEQ HLQMYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1	5	11,836
30	MGSWHYFKDHLAEIKGLLEALGGSEAEALAHFEMAIADFEHN LQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1	5	11,436
31	MGSWHYFKGHLAEIKNHLEALGGSEAEALAHFERAIAAFERS	DR5	F1	7	10,822
	LQWYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN				
32	MGSWYFKEHLAYIKKELEALGGSEAEALAHFESAIVFESTL QYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1	4	10,677
33	MGSWTYFKEHLAEIKYMLEALGGSEAEALAHFEVAIADFEKM LQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1	8	10,256
34	MGSWWLFKDHLAEIKTALEALGGSEAEALAHFEMAIAAFKQ LQYYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	DR5	F1	3	9,748
35	MGSWSEFYNRDLAIESRLALGGSEAEALFEIQIARFEKVL QAYKGGKGNPEVEALRGEARAIFAELYAYRHN	KIR	C2	5	8,399

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Objetivo	Lib.	Recuento	Relación de ELISA
36	MGSWYEFYNRLYAIEIRLYALGGSEAEIAAFEKEIAAFSESEL QAYKG KGNPEVERLRV R AAKIR VILQ AYR H N	KIR	F3	2	4,244
37	MGSWLWFKIFLAIEIKYFLEALGGSEAEIAAFDFEIHAFHVEL FAYKGGKGNPEVEVLREVAAEIRWDLQAYRHN	KIR	C1	1	4,170
38	MGSWTEFQSRDLDAIHSRLRALGGSEAEIAAFEKEIAAFSE LQAYKGGKGNPEVELLRDDAAAFIRHFLQAYRHN	PD-L1	F3	2	8,682
39	MGSWQEFDDRLNAIKARLQALGGSEAEIAAFEKEIAAFSE LQAYKGGKGNPEVEDLRDDAAAFIRFLQAYRHN	PD-L1	F3	2	7,413
40	MGSWYEFQNRHLHAIHERNLALGGSEAEIAAFEKEIAAFSE LQAYKGGKGNPEVELLRDDAAAFIRHFLQAYRHN	PD-L1	F3	2	6,345
41	MGSWFEFQDRLTAINERLSALGGSEAEIAAFEKEIAAFSE LQAYKG KG N P E V ETLS D AAFIR R FLQAYRH N	PD-L1	F3	2	6,015
42	MGSWYEFESRLDAIHERLHALGGSEAEIAAFEKEIAAFSE LQAYKGGKGNPEVENLRGDAAAFIRHFLQAYRHN	PD-L1	F3	6	4,882
43	MGSWYEFNHRDLDAISKRLNALGGSEAEIAAFEKEIAAFSE LQAYKGGKGNPEVEELRGDAAAFIRHFLQAYRHN	PD-L1	F3	2	2,982
44	MGSWFEFENRHLHAIVHRLGALGGSEAEIAAFEKEIAAFSE LQAYKGGKGNPEVETLRADAAAFIRHYLQAYRHN	PD-L1	F3	2	2,764
45	MGSWVFKVDLATIKYILEALGGSEAEIAFEGEIAGFEYSL QFYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	TIM3	F1	2	5,788
46	MGSWTIFKEWLAFIKTDLEALGGSEAEIAAFEGWIASFEME LQKYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	PD1	F1	14	17,145
47	MGSWVMFKWLLADIKSHLEALGGSEAEIAAFEGFIAAFETH LQVYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	PD1	F1	4	8,132
48	MGSWYAFKDYLDADIKGWLEALGGSEAEIAAFEFIAARFELEL QAYKGGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN	PD1	F1	2	3,295

Las fusiones de marca FLAG N-terminal de PB04 (SEQ ID NO:182) y α 3D (SEQ ID NO:49) se expresaron y se purificaron de cultivos de *E. coli*. A través de la evaluación por medio de un ensayo ELISA, la FLAG-pb04 purificada se une de una manera dependiente de la dosis a pocillos de microtitulación revestidos con PD-L1-Fc. En contraste, la FLAG- α 3D no exhibe unión detectable a la proteína objetivo PD-L1-Fc (FIGURA 3D). Los resultados demuestran que la modificación de la secuencia de andamiaje de referencia (SEQ ID NO:1) es efectiva en la provisión de una fuente consistente de DBDpp que tienen la capacidad de unirse, con especificidad novedosa, a un conjunto diverso de objetivos de interés.

Ejemplo 3 Proteínas de Fusión de DBDpp

Para evaluar la naturaleza modular de los DBDpp como un elemento de unión, el DBDpp CD137-sustancia aglutinante, bb10 (SEQ ID NO:19), se reformateó como una fusión a la terminal ya sea N o C de la cadena pesada de un anticuerpo derivado de la secuencia del anticuerpo monoclonal específico para RSV palivizumab (SYNAGIS^{MR}) (mostrado esquemáticamente en las FIGURAS 4A y 4B, respectivamente). Como un comparador se generaron fusiones análogas utilizando la secuencia parental de DBDpp (SEQ ID NO:1), la cual no se sabe que exhiba alguna especificidad de unión. Las proteínas se produjeron en células de suspensión HEK293F que se transfectaron de manera transitoria con relaciones equimolares de la fusión bb10 de cadena pesada independiente y las construcciones de expresión de ADNc de cadena ligera, y se purificaron a través de métodos convencionales de afinidad por la proteína A. La separación por medio de SDS-PAGE de muestras purificadas indicó que la migración de proteínas de fusión de bb10 de cadena pesada (DBDpp) fue equivalente a las predicciones con base en el peso molecular (datos no mostrados).

El análisis por medio de SEC indicó que las fusiones de anticuerpo bb10-DBDpp no se agregaron y emigraron como se predijo en relación con los estándares de tamaño (datos no mostrados). Las fusiones SYN-bb10 y bb10-SYN demuestran una migración similar entre sí, pero corrieron más rápido que el anticuerpo SYNAGIS^{MR} parental.

Los anticuerpos biespecíficos, SYN-bb10 y bb10-SYN exhiben unión tanto a CD137 como a RSV (FIGURAS 4C-4D; los cuadros cerrados son bb10-SYN, los círculos cerrados son SYN-bb10)), lo que demuestra que se confirió una actividad de unión novedosa a la secuencia de DBD parental y la funcionalidad del DBDpp se retiene como la fusión tanto N-terminal como C-terminal. En contraste, las fusiones entre un andamiaje de proteína alfa-hélica sin objetivo y SYN (DBD-SYN para la fusión N-terminal, círculos abiertos; SYN-DBD para la fusión C-terminal, cuadros abiertos) mostraron unión únicamente a RSV, pero no se confirió unión a CD137.

La unión de DBDpp, bb10 a CD137 se demuestra utilizando dos diferentes métodos experimentales: ELISA (FIGURAS 4C-4D) y FACS (FIGURAS 6A-6C). En estos ensayos el antígeno objetivo se presenta y se reconoce finalmente en tres formatos diferentes: ya sea unido directamente a plástico (FIGURAS 4C-4D) o in situ, como parte de una membrana celular (FIGURAS 6A-6C).

El tratamiento de PBMCs con SYN-bb10 y bb10-SYN demuestra que además de la unión, ambas proteínas de fusión tienen la capacidad de inducir una respuesta biológica corriente abajo en células objetivo (FIGURAS 7A-7D).

La estabilidad in vivo es crucial para la eficacia clínica de la mayoría de productos bioterapéuticos. Las mediciones farmacocinéticas de fusiones de bb10 (SYN-bb10 y bb10-SYN) se realizaron para evaluar la estabilidad relativa de DBDpp en comparación con el asociado de fusión de mAb (FIGURA 8). La estabilidad in vivo se determinó por medio del análisis de la unión tanto a RSV como a CD137 de los anticuerpos biespecíficos presentes en el suero de ratones CD1 que recibieron una inyección intravenosa individual (1 mg/kg) de las proteínas de fusión. Las muestras de suero se recolectaron en 15 minutos y 48 horas, y se sometieron a un ensayo ELISA. Las proteínas de fusión de DBDpp tanto N-terminales como C-terminales demuestran estabilidad sostenida in vivo.

Ejemplo 4. Uso de DBDpp en la Purificación por Afinidad

Ocho ligandos de DBDpp que se unen a CD137 (SEQ ID NOS:12-19) se reformatearon como proteínas de fusión de hexahistidina N-terminales. Sus secuencias marcadas y secuencias precursoras correspondientes se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5 - Proteínas de Fusión de hexahistidina N-terminales preparadas a partir de las SEQ ID NOS:12-19

SEQ ID Precursora NO:	Nueva Seq ID	
12	51	MGSVWVEFGHRLWAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEKLRQAAAFIRFRLQAYRHNGGGGSHHHH HH
13	52	MGSVWVEFANRLWAIDQRLFALGGSEAEAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEHLRDQAAAFIRHKLQAYRHNGGGGSHHHH HH
14	53	MGSWYEFNRHRLWAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEGLREAAAFIRAKLQAYRH NGGGGSHHHH HH
15	54	MGSWYEFMRRLWAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEALRAKAAAYIRWKLQAYRHNGGGGSHHHH HH
16	55	MGSWFEFNHRLWAINERLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVERLRSMAAAFIRYKQLQAYRHNGGGGSHHHH H
17	56	MGSWYEFGRHRLWAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEYLRETAAHIRTRLQAYRHNGGGGSHHHH HH
18	57	MGSWYEFHYRLHAIDQRLYALGGSEAEAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNPEVEELRIKAAAFIRDLQAYRHNGGGGSHHHH H
19	58	MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAEAAFLGEIWAFAFEMELAAAYKGKGNPEVEALGREAAAIRMELQAYRHNGGGGSHHHH HH

Cada fusión se expresó por separado en células BL21 (DE3) de *E. coli*. Después de la lisis de células y la purificación utilizando la cromatografía de iones de metal inmovilizados cada uno de los ligandos de DBDpp que se unen a CD137 se purificó de nuevo utilizando la HPLC de fase inversa. Cada una de las columnas de HPLC (20 x 100 mm C-4, Western Analytical) se eluyó con 0,1% de TFA:Acetonitrilo (88:12 durante 2 minutos seguido por un gradiente lineal a 58:42 en 15 minutos). El pico mayor en aproximadamente 12 minutos correspondió al ligando objetivo (véase la flecha en la Figura 9). Los ligandos purificados se liofilizaron antes del uso adicional.

La identidad y la pureza de cada uno de los ligandos se confirmó por medio de la espectrometría de masas por electropulverización (Tabla 6) y SDS-PAGE (Figura 10). La Tabla 6 muestra el peso molecular calculado para cada uno de los DBDpp que fijan como objetivo el CD137, con base en su secuencia. La Tabla 6 también muestra el peso molecular esperado para cada uno de los DBDpp después del reemplazo de la metionina N-terminal con una marca de hexahistidina. La Tabla 6 también muestra los pesos moleculares observados. Para cada uno de los DBDpps que fijan como objetivo el CD137, con excepción de la SEQ ID NO: 54, el peso molecular observado se correlacionó bien con el peso molecular esperado, lo que indica que las especies dominantes en la muestra purificada incluyeron la marca de hexahistidina. Para la SEQ ID NO:54 la especie que contenía la metionina fue la especie mayor.

Tabla 6 - Comparación del peso molecular esperado y el peso molecular observado para las 8 proteínas SEQ ID NOS: 51-58

Seq ID	Peso Molecular Calculado	Peso Molecular Esperado (sin Met)	Peso Molecular Observado
51	9596	9465	9464
52	9501	9370	9369
53	9500	9369	9368
54	9569	9438	9568
55	9651	9520	9518
56	9585	9454	9453
57	9643	9512	9511
58	9207	9076	9075

La FIGURA 10 muestra un análisis de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de cada uno de los DBDpps que fijan como objetivo el CD137 con una marca de hexahistidina. El carril 1 es una escalera de peso molecular (kilodaltons), el carril 2 es la SEQ ID NO:58 y los carriles 3-9 corresponden a las SEQ ID NOS: 51-57, respectivamente. Cada uno de los carriles muestra una banda limpia y precisa sin salpicadura o evidencia de bandas más pequeñas que sugerirían la descomposición del DBDpp.

La FIGURA 11 muestra el espectro de masas por electropulverización simplificado del DBDpp de acuerdo con la SEQ ID NO:54, en el cual se aclaró que las especies dominantes en la muestra seguían siendo una proteína con la metionina N-terminal, a diferencia de la marca de His6.

De acuerdo con varias modalidades dadas a conocer en este documento, los métodos de producción dados a conocer en este documento para la producción de DBDpp marcados dan por resultado las especies dominantes (por ejemplo, más de 50%, más de 60%, más de 70%, más de 80%, etcétera) de una corrida de producción determinada que es la especie marcada. Como se planteaba anteriormente, se pueden utilizar marcas diferentes de His6, dependiendo de la modalidad.

La proteína objetivo, CD137, se construyó como una proteína de fusión de CD137-Fc-His6. Una quimera (Leu24-Gln186)/Fc de Humano r (Lys100-Lys329) (SEQ ID NO: 59) con marca de hexahistidina se preparó por medio de la transfección transitoria de células HEK293 y se purificó del sobrenadante purificado de células utilizando la cromatografía de iones de metal inmovilizados (IMAC) y luego el amortiguador se intercambió en PBS. Este material se comportó de manera idéntica a la proteína auténtica adquirida de fuentes comerciales (RnD Systems) y se utilizó como un control positivo para CD137.

La SEQ ID NO: 59 se muestra a continuación:

LQDPCSNCPAGTFCDDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRT
 RKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRP
 WTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQDIEGRMDKSC
 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHH

La unión de los ocho ligandos de DBDpp marcados con his (SEQ ID NOS:51-58) a la proteína objetivo de CD137 se evaluó utilizando la interferometría de biocapa (ForteBio, Menlo Park, CA) de acuerdo con métodos establecidos. El ensayo de unión se construyó al inmovilizar la CD137-Fc-His6 a través de proteína A y luego incubar en soluciones de cada uno de los ligandos de DBDpp durante 5 minutos para medir la fase de asociación (unión). Los sensores luego se colocaron en amortiguador para supervisar la fase de disociación y los sensogramas completos (tiempo en segundos en el eje X y nm en el eje Y) se muestran en las FIGURAS 12A, 12C, 12E, 12G, 12I, 12K, 12M y 12O para los DBDpps de las SEC ID NOS: 51-58, respectivamente. Los datos se ajustaron por medio del análisis de régimen permanente, el cual se representa en cada una de las FIGURAS 12D, 12F, 12H, 12J, 12L, 12N y 12P para los DBDpp correspondientes. Los datos relevaban constantes de afinidad de rendimiento para CD137 en el intervalo de 140 nM - 1,7 μ M (Tabla 7).

Tabla 7: Constantes de afinidad calculados para los 8 ligandos SEQ ID NOS: 51-59

SEQ ID	K _D (M)
51	$6,4 \times 10^{-7} \pm 1,8 \times 10^{-7}$
52	$4,6 \times 10^{-7} \pm 8,5 \times 10^{-8}$
53	$1,4 \times 10^{-7} \pm 3,0 \times 10^{-8}$
54	$4,0 \times 10^{-7} \pm 9,4 \times 10^{-8}$
55	$1,7 \times 10^{-7} \pm 4,0 \times 10^{-8}$
56	$7,7 \times 10^{-7} \pm 1,2 \times 10^{-7}$
57	$1,0 \times 10^{-6} \pm 1,7 \times 10^{-7}$
58	$1,7 \times 10^{-6} \pm 2,6 \times 10^{-7}$

Cuatro de las ocho proteínas de fusión de his se acoplaron a los medios de cromatografía Sepharose 4 Fast Flow^{MR} activados con NHS (GE Healthcare Life Sciences) utilizando las directrices del fabricante durante 4 horas a temperatura ambiente y luego se lavaron antes del ensayo de la densidad de ligandos (Tabla 8).

Tabla 8. Densidad de ligandos medida de resinas de afinidad

Seq ID	Concentración de acoplamiento de ligandos mg/ml	Densidad del ligando de Resina mg/ml
51	4,9	10
52	1,7	3,3
53	3,9	7
56	3,3	6,5
58	3,9	5,4

Para cada una de las resinas una porción de la resina lavada se empacó en una columna de vidrio de 3 x 25 mm (Omnifit) y se adaptaron a un cromatógrafo BioLogic^{MR} (Bio-Rad). Las resinas se equilibraron con 1 ml de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) a un caudal de 0,5 ml/minuto. Una muestra de sobrenadante de células de ovario de hámster chino (CHO) que contenía CD137 (el cual había sido agregado a una concentración de 0,25 mg/ml) se aplicó a la columna (550 μ g de CD137-Fc-His a 0,2 ml/minuto) y fue seguido por el lavado (7,5 ml con PBS a 0,5 ml/minuto) y elución (2 ml con 50 mM de acetato de Na pH 3 a 0,2 ml/minuto). Antes de evaluar la unión de otra muestra, las resinas se regeneran con 1 ml de guanidina-HCl 6 M a 0,5 ml/minuto y se re-equilibraron con 25 volúmenes de columna con PBS a 0,5 ml/minuto.

La FIGURA 13 representa el cromatograma de la purificación de la proteína CD137-Fc-His6 del sobrenadante de CHO. El pico que eluye a 8-9 ml corresponde a la proteína CD137-Fc-His6 eluida. Estos datos demuestran que los DBDpp dados a conocer en este documento se puede utilizar exitosamente para capturar una proteína objetivo de una muestra con un alto grado de especificidad, incluso cuando la muestra de entrada comprende una mezcla compleja de proteínas biológicas que tienen el potencial de interferir con interacciones de objetivo-sustancia aglutinante.

Para evaluar adicionalmente la especificidad de unión, las fracciones de la fase de elución se evaluaron por medio de SDS-PAGE para confirmar que la resina de afinidad tenía la capacidad de purificar el CD137 mientras que permitía la remoción de una proporción considerable de la proteína de célula hospedante. La FIGURA 14A muestra un gel teñido con azul de Coomassie con una escala de peso molecular en el carril 1 (kilodaltons). El carril 2 muestra una proteína CD137 purificada con IMAC de control positivo. El carril 3 representa un control negativo el cual es CD137-Fc-His6 añadido en el sobrenadante de CHO a una concentración de 0,25 mg/ml, lo cual representa una falta de purificación del CD137 del sobrenadante. El carril 4 es un eluato después de la purificación con el DBDpp de la SEQ ID NO. 58, el carril 5 es un eluato después de la purificación con el DBDpp de la SEQ ID NO. 51, el carril 6 es un eluato después de la purificación con el DBDpp de la SEQ ID NO. 52, el carril 7 es un eluato después de la purificación con el DBDpp de la SEQ ID NO. 57 y el carril 8 es un eluato después de la purificación con el DBDpp de la SEQ ID NO. 57. Estos datos muestran que el DBDpp purifica específicamente proteínas objetivo, de las cuales el CD137 es un ejemplo no limitante. El carril 3 muestra claramente material proteico adicional en el carril, el cual es resultado de los componentes de proteína del sobrenadante de células CHO. En contraste los carriles 4-8 muestran bandas claras, con pocas o sin otras especies de proteínas, lo cual es similar al CD137 purificado por IMAC de control positivo.

Adicionalmente, el análisis de inmunotransferencia Western mostrado en la FIGURA 14B refuerza además la capacidad de los DBDpp descritos en este documento para aislar una proteína objetivo específica de una muestra que contiene proteína compleja. El diseño de los carriles es el mismo que aquel descrito anteriormente para la FIGURA 14A. Un anticuerpo conjugado anti-penta-His-HRP (Qiagen) se utilizó para la detección. Como es sugerido inicialmente por el tinte de Coomassie, el análisis de inmunotransferencia Western confirma que los DBDpp descritos en este documento pueden unirse exitosamente a una proteína objetivo con especificidad, y luego se pueden utilizar para el aislamiento específico de esa proteína de una muestra de inicio compleja. Cada uno de los DBDpp que fijan como objetivo el CD137 en los carriles 4-8 también muestran la capacidad para purificar el C137, si no es que mejor, del mismo modo que la purificación con la cromatografía de iones de metal inmovilizados (compare los carriles 4-8 con el carril 2). Como el CD137 es solo una modalidad no limitante, los DBDpp dados a conocer en este documento, de acuerdo con modalidades adicionales se pueden utilizar para purificar una amplia variedad de proteínas objetivo de varias muestras de inicio. En algunas modalidades, la muestra de inicio es un fluido biológico mientras que en otras modalidades, otros tipos de muestras líquidas o gaseosas constituyen el material de inicio del cual se debe capturar y purificar una proteína objetivo.

Ejemplo 5. Caracterización de la Estabilidad de DBDpp

El presente ejemplo se realizó para evaluar la estabilidad de los DBDpp de acuerdo con modalidades dadas a conocer en este documento.

Las fusiones de DBDpp-6xHis (pb04 y pb06) y las fusiones de scFv-6xHis se expresaron a través de reacciones de transcripción y traducción in vitro (NEB, PureExpress). Las muestras se diluyeron en amortiguador de bloqueo de ELISA (Thermo Fisher) 30 veces. Las muestras individuales se incubaron subsecuentemente a ya sea 25°C, 40°C, 55°C, 70°C o 100°C durante 2 minutos y luego se regresaron rápidamente a la temperatura ambiente. El incremento de temperatura, seguido por el enfriamiento rápido puede causar la desnaturalización de la proteína u otra descomposición de la estructura tridimensional de proteínas que reducen la interacción con y/o la unión a objetivos. La capacidad de proteínas para unirse con un ligando, tal como un antígeno tumoral objetivo, después de ser expuestas a condiciones desnaturalizantes indica ya sea una estabilidad mejorada durante la exposición a una temperatura elevada o una capacidad para replegarse y mantener la función después de la exposición. No obstante, la estabilidad térmica elevada hace que estas proteínas sean candidatos atractivos para mantener la función durante y después de las condiciones rigurosas de la producción, almacenamiento, descongelamiento y uso clínico.

Las muestras expuestas al calor se diluyeron en serie en un amortiguador de ELISA y se midieron por la unión a PD-L1-Fc en un ensayo ELISA. Las proteínas unidas se detectaron con anticuerpo policlonal anti-6xHis de conejo conjugado con HRP (Abcam). La FIGURA 15A representa la unión de scFv DR5 a células que expresan el PD-L1. Puesto que este scFv particular no está configurado para unirse a PD-L1, esta función como un control negativo, y como se esperaba, sin unión se detecta para cualquiera de los scFv DR5, independientemente de las temperaturas a las cuales se expusieron. La FIGURA 15B muestra que un scFv dirigido contra PD-L1 se unirá exitosamente a su objetivo después de la exposición a temperaturas elevadas, hasta aproximadamente 55°C. Sin embargo, la exposición a temperaturas de 70°C muestra una disminución en la capacidad de los scFv para unirse exitosamente a PD-L1, que es indicativa de la naturaleza lábil al calor de los scFv. Después de calentar los scFv a 100°C, la unión del PD-L1 objetivo se elimina completamente.

En contraste, los DBDpp exhiben estabilidad térmica mejorada. La FIGURA 15C representa datos que exhiben la capacidad de un DBDpp (pb04 en esta modalidad no limitante) para unirse a un PD-L1 objetivo, incluso después de ser expuesto a temperaturas elevadas de 100°C. La FIGURA 15D muestra datos similares para una modalidad no limitante, diferente de un DBDpp (pb06). Nuevamente, los DBDpp retienen la capacidad para unirse a su objetivo después de la exposición a temperaturas de hasta 100°C.

Estos datos sugieren que los DBDpp, de acuerdo con varias modalidades dadas a conocer en este documento, tienen la capacidad para resistir la desnaturalización y/o replegarse después de la exposición a temperaturas elevadas, y aún

retener la capacidad para unirse a un objetivo deseado. Como se planteaba anteriormente, esto hace que los DBDpp sean una porción de fijación como objetivo atractiva ya que su estabilidad térmica incrementada sugiere que son suficientemente consistentes para manejar los procesos de manufactura (u otros protocolos de producción/manejo) los cuales pueden implicar temperaturas elevadas que otros tipos de porciones de fijación como objetivo, tales como scFv.

Ejemplo 6. Reactividad Cruzada para Especies de los DBDpp

El presente ejemplo se realizó para establecer la especificidad para especies de DBDpp como se dan a conocer en este documento.

La FIGURA 16A establece que un DBDpp soluble seleccionado para la unión a PD-L1 de humano (pb04 en esta modalidad no limitante), también se puede unir a PD-L1 de cynomolgus (*Macaca fascicularis*), como se evalúa por medio de un ensayo ELISA. El PD-L1 de humano o el PD-L1 de cynomolgus se inmovilizó en pocillos separados de una placa de ELISA. El DBDpp soluble (marcado con FLAG) dirigido contra PD-L1 se incubó en las placas respectivas para evaluar el grado de unión con PD-L1 de cada especie. Como se muestra, el pb04 DBDpp se une a PD-L1 tanto de humano como de cynomolgus. La FIGURA 16B demuestra además que el PD-L1 de origen humano y de cynomolgus es unido por un CAR que comprende un DBDpp (pb04 en esta modalidad no limitante) expresado sobre la superficie de células T de humano. Como es exhibido por los datos de citometría de flujo las células T DBDpp CAR dirigidas a PD-L1 se pueden unir a PD-L1 de humano soluble y PD-L1 de cynomolgus (97,7% para humano y 97,1% para cynomolgus).

Ejemplo 7. Las células T CAR que Expresan DBDpps se Unen a Moléculas Objetivo

El presente ejemplo se realizó para establecer la capacidad de CARs expresados de manera transitoria que comprenden DBDpp en esta modalidad no limitante, para unirse a un objetivo de tumor que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% idéntica a los residuos 19-305 de la SEQ ID NO:187 (CD123).

Las células 293 T se transfectaron de manera transitoria con vectores de expresión pcDNA3 que codifican CARs que contienen DBDpp utilizando (véase, por ejemplo, la FIGURA 5B) Lipofectamine 3000^{MR} (Life Technologies). Después de 24 horas, las células se recolectaron utilizando CellStripper^{MR}. Las células se evaluaron por la expresión de CAR utilizando un anticuerpo anti-FLAG etiquetado con fluorescencia. Los CARs que contienen DBDpp que se unen a CD123 se midieron al incubar células con una proteína de fusión Fc que comprendía el dominio extracelular de CD123 fusionada a Fc de IgG1 de humano en medios de cultivo de células a 37°C durante 30 minutos, lavar y luego la detección con un anticuerpo anti-IgG de humano PE. Tanto la unión a CD123 como la expresión de CAR (Marca FLAG) se sometieron a ensayo por medio de la citometría de flujo. Los datos se muestran en la FIGURA 17, y cada punto de datos indica la expresión promedio de FLAG y la unión a CD123 para cada uno de los DBDpp-CAR de múltiples experimentos.

La FIGURA 17 resume datos de citometría de flujo que demuestran que los CARs que comprenden un scFv que se une a CD123 (32716) o un DBDpp expresado en células T de humano se unen a CD123 soluble, como una modalidad no limitante de un objetivo de interés. El eje X es una medida de la expresión de CAR en células T de humano. El eje Y representa la unión de CAR del Fc-CD123.

Ejemplo 8. Las Células T que Expresan CAR que Comprenden DBDpp (DBDpp-CAR) Provocan la Señalización Intracelular

Para evaluar la capacidad de CARs que comprenden un DBDpp (DBDpp-CAR) para iniciar la transducción de señales, una línea de células reporteras Jurkat, que contenía un intensificador del factor nuclear de células T activadas (NFAT) acoplado a un gen reportero de luciferasa, se expresó de manera estable en células Jurkat. Varias construcciones de CAR fueron electroporadas en la línea de células reporteras Jurkat. Después de 24 horas pos-electroporación, la expresión de CAR se evaluó por medio de la detección con un anticuerpo monoclonal anti-FLAG etiquetado con fluorescencia. Las células Jurkat que expresaban el DBDpp-CAR luego se co-cultivaron con células tumorales CD123+ (BDCM, leucemia mielógena aguda, como una modalidad no limitante) durante 6 horas después de lo cual la señalización mediada por NFAT se midió a través de la adición a las células de reactivo de ensayo de luciferasa (Promega) y la cuantificación de unidades relativas de luminiscencia (RLU), como se muestra en la FIGURA 18.

Estos datos demuestran que, en esta modalidad no limitante, los DBDpp-CARs se expresan en células (por ejemplo, células T de humano), y cuando se expresan de esta manera, pueden iniciar una cascada de señalización intracelular después de la exposición a un objetivo (Fc-CD123 en esta modalidad no limitante) unido por el DBDpp.

Ejemplo 9. Los DBDpp-CARs Expresados en Células T de Humano Producen Citocinas en la Unión a Objetivos

La vinculación de un objetivo por una célula T que expresan CAR puede dar por resultado la secreción de citocinas.

Por consiguiente, las células 293T se transfectaron de manera transitoria con vectores de empaque lentivirales de

tercera generación (pRSV-REV, pMDLg/pRRE y pMD2.G) con vectores pELNS que codifican DBDpp-CARs utilizando Lipofectamine 3000^{MR}. Seis horas después de la transfección los medios se cambiaron, luego los medios que contenían lentivirus se recolectaron en 30 y 54 horas después de la transfección, se reunieron, luego se centrifugaron para retirar los residuos de células. Los lentivirus luego se prorrataron y se almacenaron a -80°C hasta que se utilizaron para la transducción viral. La transducción de células T de humano con lentivirus CAR se realizó utilizando PBMCs de humano totales, activadas con cuentas de activación de células T α CD3/CD28 en medios de cultivo complementados con 40 U/ml de IL-2. Después de 24 horas, 2×10^6 PBMCs se colocaron en placas por pocillo en una placa de cultivo de tejido de 6 pocillos con 1 ml de medios de cultivo y 3 ml de medios que contenían lentivirus complementados con 40 U/ml de IL-2 y sulfato de protamina. Las placas luego se centrifugaron durante 2 horas a $1000 \times g$ a 32°C y luego se incubaron durante toda la noche a 37°C. Al siguiente día el procedimiento de transducción de lentivirus se repitió con medios de cultivo nuevos y medios que contenían lentivirus. 72 horas después de la activación inicial de células, las cuentas de activación de células T se retiraron, luego las células T se cultivaron para la expansión a $\sim 0.25\text{--}0.5 \times 10^6$ células T/ml en medios nuevos complementados con 100 U/ml de IL-2. Cada 2-3 días las células T se complementaron con medios adicionales de células T e IL-2, hasta que se utilizaron para los ensayos de citocinas (descritos posteriormente) 7-10 días después de la activación inicial.

La producción de citocinas en respuesta a la expresión de antígenos objetivo (CD123 en esta modalidad no limitante) se evaluó al cultivar 25,000 células T transducidas (7 días después de la activación) con 25,000 células tumorales que no son objetivo (K562, CD123-) u objetivo (BDCM, CD123+) por pocillo en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas los sobrenadantes de cultivo se recolectaron y la producción de citocinas se evaluó por medio de un ensayo ELISA. Los sobrenadantes de cultivo se diluyeron 1:5 antes del ensayo ELISA. Similarmente, la producción de citocinas en respuesta a la expresión de antígenos objetivo de PD-L1 se evaluó al cultivar 25,000 células T transducidas (7 días después de la activación) con 25,000 células tumorales que no son objetivo (K562, PD-L1-) u objetivo (SUDHL-1, PD-L1+) por pocillo en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas los sobrenadantes de cultivo se recolectaron y la producción de citocinas se evaluó por medio de un ensayo ELISA. Los sobrenadantes de cultivo se diluyeron 1:5 antes del ensayo ELISA.

La FIGURA 19A demuestra que las células T que expresan DBDpp-CARs que se unen a CD123 producen interferón gamma ($\text{IFN}\gamma$) después de la estimulación con células BDCM CD123+, pero no la línea de células CD123- K562. La FIGURA 19B demuestra que las células T que expresan DBDpp-CARs que se unen a CD123 producen interleucina 2 (IL2) después de la estimulación con células BDCM CD123+, pero no la línea de células CD123- K562. La FIGURA 20A demuestra que las células T que expresan DBDpp-CARs que se unen a PD-L1 producen interferón gamma ($\text{IFN}\gamma$) después de la estimulación con células SUDHL-1 PD-L1+ pero no la línea de células PD-L1- K562. La FIGURA 20B demuestra que las células T que expresan DBDpp-CARs que se unen a PD-L1 producen interleucina 2 (IL2) después de la estimulación con células SUDHL-1 PD-L1+ pero no la línea de células PD-L1- K562.

Ejemplo 10. Las Células T que Expresan DBDpp-CARs Proliferan Cuando son Co-cultivadas con Células Tumorales que Expresan Objetivos

Las células T que expresan CARs que se unen a objetivos pueden proliferar después de la vinculación de objetivo soluble o células tumorales que expresa el objetivo.

La proliferación de células T de humano transducidas con DBDpp-CAR en respuesta a células tumorales que expresan un antígeno objetivo (del cual CD123 es un ejemplo no limitante) se evaluó al cultivar células T transducidas (1×10^5 , 10 días después de la activación) con 1×10^5 células tumorales pre-tratadas con mitomicina C en placas de 24 pocillos. Las células tumorales incluyeron K562 que no expresa el objetivo (CD123-), líneas que expresan el objetivo intermedio KG1a y MOLM-13 (CD123-intermedio) y BDCM (CD123-alto). Las células T transducidas se recolectaron y se contaron después de 96 horas de co-cultivo con células tumorales. Este planteamiento también se utilizó en la evaluación de la proliferación de células T en respuesta a células tumorales que expresaban el antígeno objetivo PD-L1. Las células tumorales incluyeron K562 que no expresaba el objetivo (PD-L1-), líneas que expresaban el objetivo intermedio BDCM y H460 (PD-L1-intermedio) y SUDHL-1 (PD-L1-alto). Las células se recolectaron y se contaron después del cultivo durante 96 horas. Los datos de esos experimentos de proliferación se muestran en la FIGURA 21 y la FIGURA 22 respectivamente.

Las barras del histograma mostrado en la FIGURA 21 representan (desplazándose de izquierda a derecha): el cultivo de células T DBDpp-CAR solas, el co-cultivo con células K562 negativas para CD123, el co-cultivo con células KG1a que expresaban CD123 a bajo nivel, el co-cultivo con células MOLM-13 que expresaban CD123 a bajo nivel y el co-cultivo con células BDCM que expresaban CD123 a alto nivel. Como es indicado por la altura de las barras del histograma, cuando se incubó con células que expresan CD123 (en niveles intermedio o alto), hay un incremento correspondiente en la proliferación de células T. Estos datos indican las células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el CD123, proliferan en respuesta a la unión a CD123 de manera comparable a, o en algunas modalidades a un grado mayor que, los scFv que fijan como objetivo el CD123. Similarmente, en la FIGURA 22, las barras del histograma representan (desplazándose de izquierda a derecha): el cultivo de células T PD-L1-DBDpp-CAR solas, el co-cultivo con células K562 negativas para PD-L1, el co-cultivo con células BDCM que expresaban PD-L1 a nivel intermedio, el co-cultivo con células SUDHL-1 que expresaban PD-L2 a alto nivel y el co-cultivo con células H460 que expresaban PD-L1 a nivel intermedio. Estos datos muestran una especificidad de la respuesta de las células T al objetivo de los

DBDpp (por ejemplo, está limitada a sin respuesta cuando el objetivo no está presente). De esta manera, como antes, estos datos indican las células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el PD-L1, proliferan específicamente en respuesta a la unión a PD-L1. Como se planteaba anteriormente, el CD137, CD123 y PD-L1 son solamente ejemplos no limitantes de los objetivos a los cuales los DBDpp se pueden unir específicamente y de esta manera, pueden inducir (en conjunción con un CAR en una célula T, célula NK, etcétera) la función de células inmunes específicas para un objetivo.

Ejemplo 11. Las Células T Transducidas con DBDpp-CAR no Expresan Fenotipos Asociados con el Agotamiento de Células T

La exposición persistente de células T a un antígeno y/o señales inflamatorias puede dar por resultado el "agotamiento" de células T, caracterizado por la pérdida de la función efectora y la expresión de múltiples receptores inhibitorios, tales como LAG-3, PD-1 y TIM-3. Este agotamiento también puede resultar de la estimulación espontánea de células T a través de mecanismos independientes de antígenos que agregan receptores de células T. Una consecuencia del agotamiento de células T puede ser un control reducido de tumores y de esta manera la evasión de un agotamiento excesivo es un atributo deseable en la inmunoterapia para cáncer que utiliza células T.

Para evaluar el agotamiento potencial independiente de antígenos en células T que expresan DBDpp-CARs, las células T transducidas (día 10 después de la activación) se tiñeron con anticuerpos contra CD3 y marcadores del agotamiento de células T (LAG3, PD1 y TIM3). La FIGURA 23A resume datos de experimentos individuales a través de varios donadores de células T. Los datos demuestran que la expresión de los marcadores de agotamiento no se aumentó en varias células T DBDpp-CAR que se unen a CD123. La FIGURA 23B muestra datos de citometría de flujo representativos de la expresión de LAG-3, PD1 y TIM-3 en células T transducidas ya sea con un CAR que contiene scFv (hilera superior) o un DBDpp-CAR (en este experimento particular cg06 que fija como objetivo el CD123) 10 días después de la activación inicial de las células T. La similitud de estos datos demuestran nuevamente que las células T DBDpp-CAR no regulan por incremento la expresión de marcadores de agotamiento, lo cual presta apoyo adicional a su eficacia en la inmunoterapia para cáncer.

Ejemplo 12. Las Células T que Expresan DBDpp-CAR Exhiben Desgranulación y Citotoxicidad Tumoral Específica para Objetivos

Desgranulación de células T, células NK y muchas células de linaje monocítico (todas las cuales se pueden utilizar dependiendo de la modalidad). La desgranulación puede dar por resultado la liberación de, dependiendo del tipo de célula, moléculas antimicrobianas, citotóxicas u otras moléculas de gránulos secretorios en la célula inmune. Las moléculas como perforina (una citotoxina de forma poros) o granzimas (serina proteasas que provocan la apoptosis en la célula objetivo) ayudan a las células T y células NK en la aniquilación de células tumorales (u otros tipos de células).

Para evaluar la desgranulación de células T que expresan DBDpp-CARs, 1×10^5 células T transducidas (día 9 después de la activación) se cultivaron en medios de células T durante 4 horas en presencia de CD107a/LAMP1 conjugado con monensina y PE. Las células T se cultivaron solas o en presencia de 2×10^5 células tumorales que no son objetivo (K562, las cuales son CD123-) o células tumorales que expresan el objetivo (BDCM, CD123+), luego se lavaron y se tiñeron para la expresión de CD3. La desgranulación de células T luego se evaluó por medio de la citometría de flujo, regulando primero las células CD3+SSC-bajo (no tumorales), luego la células CD3+CD107a+. Los símbolos representan muestras de experimentos individuales utilizando múltiples donadores.

Las FIGURAS 24A-24D resumen estos datos. La FIGURA 24A muestra la producción de CD107a (como un marcador de la desgranulación de células T DBDpp-CAR) equivalente a controles negativos cuando las células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el CD123 son cultivadas solas. La FIGURA 24B muestra la expresión limitada de CD107a cuando las células T DBDpp-CAR son co-cultivadas con células tumorales K562 negativas para CD123. La FIGURA 24C muestra la expresión significativa de CD107a cuando las células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el CD123 son co-cultivadas con células BDCM positivas para CD123, lo que indica de esta manera que las células T, son activadas, experimentar la señalización y experimentar la desgranulación darán por resultado la erradicación de tumores. La FIGURA 24D representa datos de duplicados experimentales de co-cultivo de células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el CD123 con células BDCM positivas para CD123. Las FIGURAS 25A-25D muestran datos similares relacionados con la desgranulación de células T que expresan PD-L1-DBDpp-CARs. No solo estos datos demuestran que las células T DBDpp-CAR se desgranulan de manera efectiva, estos datos proporcionan soporte adicional para la activación dependiente del objetivo de células T que expresan DBDpp-CAR.

Ejemplo 13. La Citotoxicidad Tumoral Mediada por DBDpp-CAR es Específica para un Objetivo

La función específica para un objetivo de células T de humano que expresan DBDpp-CAR se extendió para incluir la citotoxicidad de células tumorales in vitro como se describe en las FIGURAS 26 y 27. Estos experimentos emplearon células tumorales CD123+ (BDCM, leucemia mielógena aguda) y CD123- (K562, leucemia mielógena crónica) que fueron pre-cargadas con un ligando que aumenta la fluorescencia (BATDA). Las células T que expresaban DBDpp-CAR dirigidas a CD123 se cultivaron con células tumorales durante 2 horas en varias relaciones de efector con

respecto a objetivo (E:T). El co-cultivo simulado y el co-cultivo con scFv-CARs dirigidos a CD123 se utilizaron como controles. En un grupo adicional de experimentos, las células tumorales PD-L1+ (SU-DHL-1, linfoma de células grandes) y PD-L1- (K562, leucemia mielógena crónica) fueron pre-cargadas con BATDA. Las células T que expresaban DBDpp-CAR dirigidas a PD-L1 se cultivaron con células tumorales durante 2 horas a varias relaciones de E:T. Los co-cultivos simulados se utilizaron como controles. El ligando BATDA se libera como resultado de la citólisis de células objetivo, y tras la adición de solución de europio (Eu), forma un quelato fluorescente y estable, el cual se midió utilizando un fluorómetro de resolución temporal Synergy 2 (Biotek).

Las FIGURAS 26A-26D y 27A-27F resumen datos de esos experimentos. La FIGURA 26A muestra que el co-cultivo de células T DBDpp-CAR que fijan como objetivo el CD123 con células K562 (sin expresión de CD123) produce un porcentaje de aniquilación menor que aquel de los controles de co-cultivo simulado. En contraste la FIGURA 26B demuestra que cada uno de los grupos de células T que expresan DBDpp-CAR que fija como objetivo el CD123 aniquilan células tumorales positivas para CD123 de manera más efectiva que los controles de co-cultivo simulado y, para algunos DBDpp, en comparación con células T dirigidas a CD123 con un scFv. Las FIGURAS 26C y 26D representan datos similares con células de un donador separado.

Como un ejemplo adicional, las FIGURAS 27A-27F muestran el porcentaje de aniquilación para células T DBDpp-CAR dirigidas a PD-L1. Como se planteaba anteriormente, cuando se co-cultivan con células que no expresan el PD-L1, se detecta una citotoxicidad limitada o nula (27A, 27C, 27E). Sin embargo, cuando se co-cultivan con células que expresan el marcador objetivo PD-L1, existe una citotoxicidad que se mide y excede por mucho aquella detectada en controles de co-cultivo simulado (27B, 27D, 27F). Estos datos extienden los atributos funcionales de células T que expresan DBDpp para incluir la aniquilación de células tumorales específica para el objetivo.

Ejemplo 14. Los Dominios de DBDpp se Pueden Desinmunizar y Pueden Retener una Función

Muchos productos terapéuticos tienen el potencial de causar efectos colaterales adversos, mientras que proporcionan una terapia efectiva. En algunos casos, los pacientes pueden tener una reacción inmune a un producto terapéutico (ya sea basado en fármacos o células). Debido a que los DBDpp dados a conocer en este documento son proteínas no humanas, se realizaron análisis in silico para identificar epítopos potencialmente inmunógenos y eliminarlos sin comprometer las propiedades funcionales de los DBDpp.

El análisis in silico de la secuencia de aminoácidos de cg06 (SEQ ID NO:99) identificó tres secuencias de 9 aminoácidos que comparten características con aquella de epítopos de células T de alta afinidad (umbral de unión menor que 6%) y promiscuos (presentes en más de 50% de alelos relevantes) (Singh, Bioinformatics 17:1236-1237, 2012). Las sustituciones de aminoácidos específicas dentro de cg06 se identificaron como reductoras del número de epítopos de células T predichos. Las mutaciones puntuales correspondientes se introdujeron en cg06, ya sea individualmente o en combinación, dando por resultado una serie de DBDpp-CARs "desinmunizados".

Un modelo tridimensional de un DBDpp (cg06) se muestra en la FIGURA 28A. La FIGURA 28B representa el cg06 con uno (de tres) de los epítopos potencialmente inmunógenos modificados para ser menos potencialmente inmunógenos. La FIGURA 28C representa el cg06 con dos (de tres) de los epítopos potencialmente inmunógenos modificados. La FIGURA 28D representa el cg06 con los tres epítopos potencialmente inmunógenos modificados.

Las células reporteras Jurkat fueron electroporadas con esos DBDpp-CARs desinmunizados. Después de 24 horas en cultivo la expresión de CAR en células Jurkat se evaluó mediante la tinción con anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Las células se co-cultivaron durante 6 horas con células tumorales objetivo CD123+ (KG1a con un bajo nivel de expresión de CD123 y BDCM con un alto nivel de expresión de CD123). La señalización mediada por NFAT se midió a través de la adición a las células de reactivo de ensayo de luciferasa (Promega) y la cuantificación de unidades relativas de luminiscencia (RLU).

Los datos de esos experimentos se muestran en las FIGURAS 29A-29B. La FIGURA 29A demuestra que los DBDpp-CARs que se unen a CD123 desinmunizados (cg06-1 hasta cg06-6) provocan la señalización de NFAT cuando son co-cultivados con células BDCM positivas para CD123. La FIGURA 29B demuestra además que los DBDpp-CARs que se unen al CD123 también provocan la señalización de NFAT cuando son co-cultivados con células que tienen una expresión más baja de CD123 (KG1a) - se debe tener en cuenta los niveles reducidos de RLU en comparación con la FIGURA 29A. Tomados juntos, estos datos demuestran que el potencial inmunógeno de un DBDpp que se une al objetivo se puede disminuir por medio de sustituciones específicas de residuos de aminoácidos en el DBDpp que no alteran la función del DBDpp o la dependencia de la densidad del objetivo de la señalización intracelular mediada por CAR - mientras mayor sea el grado de objetivo presente, mayor es el grado de respuesta. Estos datos también indican que los DBDpp de acuerdo con varias modalidades dadas a conocer en este documento se pueden utilizar como productos terapéuticos y de ser necesario, se pueden modificar para reducir el potencial de respuestas inmunes contra las células que contienen DBDpp-CAR (por ejemplo, células T, células NK, etcétera).

Ejemplo 15. DBDpp Bi-específicos

En algunos casos, las células objetivo (por ejemplo, células tumorales) pueden expresar más de un marcador. En

algunas modalidades, los DBD-CARs fijan como objetivo un marcador individual (por ejemplo, un marcador único de células cancerosas) en una célula objetivo. En algunas modalidades, sin embargo, ciertos marcadores no son únicos para células cancerosas, sino que también son expresados en células normales (aunque quizás a diferentes niveles). De esta manera, en varias modalidades, la fijación como objetivo de dos marcadores presenta una oportunidad para incrementar la especificidad de un agente inmunoterapéutico al diseñar un CAR que exprese un DBDpp bi-específico. En estas modalidades las células fijadas como objetivo más aniquiladas eficientemente serían aquellas que expresan ambos marcadores fijados como objetivo por el DBDpp (a pesar de la aniquilación de células la expresión de uno o el otro de los marcadores aún ocurrirá). Para someter a prueba este planteamiento, los DBDpp-CARs biespecíficos se expresaron en células Jurkat y la señalización intracelular en respuesta a la expresión en células tumorales de uno o más objetivos se midió.

Las FIGURAS 30A-30B definen la expresión en la superficie celular de CD123 y PD-L1 respectivamente en líneas de células K562 (CML); KG-1a (AML); BDCM (AML); SU-DHL-1 (LCL) y H460 (carcinoma pulmonar). La línea de células K562 no expresa ningún objetivo mientras que las líneas KG1a y BDCM expresan el CD123 y bajos niveles de PD-L1 en relación con la expresión alta de PD-L1 observada en las células CD123-negativas, SU-DHL y H460. Estas líneas de células ofrecen la oportunidad de determinar si la señalización intracelular de un DBDpp-CAR que se une a CD123 (cg06) puede ser aumentada por un cg06 que comprende CAR biespecífico (anti-CD123) fusionado a un segundo DBDpp con especificidad por PD-L1 (pb04). La FIGURA 31A demuestra que los DBDpp-CARs que comprenden cg06 únicamente, (FIGURA 31A), pb04 únicamente (FIGURA 31B), cg06 fusionado a la N-terminal de pb04 (cg06-pb04, FIGURA 31C) y pb04 fusionado a la N-terminal de cg06 9PB-04-cg06, FIGURA 31D) pueden ser transducidos y expresados en la línea de células reporteras NFAT Jurkat como se evalúa por medio de un mAb anti-FLAG que se une a los CARs. La capacidad de los CARs mono-específicos y biespecíficos para activar la vía de NFAT se evaluó al co-cultivar los diversos CARs con células tumorales con diferente nivel de expresión de CD123 y/o PD-L1. Las células se co-cultivaron con células objetivo durante 6 horas. La señalización mediada por NFAT se midió a través de la adición a las células de reactivo de ensayo de luciferasa (Promega) y la cuantificación de unidades de luminiscencia relativas (RLU) como una medida de la señalización intracelular provocada.

La FIGURA 31E representa los resultados de este experimento. El grupo de barras más hacia la izquierda y el histograma muestran el efecto de aniquilación relativo de DBDpp de cg06 contra varios tipos de células. La respuesta de señalización después del co-cultivo con BDCM sumamente CD123+ fue la más grande con este DBDpp-CAR. El siguiente grupo a la derecha representa datos que muestran la señalización intracelular después del co-cultivo del DBDpp de pb04 contra los mismos tipos de células. La señalización fue la más alta en BDCM, seguida por SUHDL1 y H460 (con referencia a las FIGURAS 30A-30B, éstas son las líneas de células de expresión más alta para CD123 y PD-L1). El siguiente grupo a la derecha representa datos que muestran la señalización intracelular de DBDpp de cg06-pb04 biespecífico (cg06 más distal a la membrana de células T en comparación con pb04). Finalmente, el grupo a la extrema derecha muestra la señalización intracelular de un segundo DBDpp biespecífico (DBDpp de pb04-cg06, donde pb04 es más distal a la membrana de células T en comparación con cg06). Estos dos grupos indican que los DBDpp-CARs biespecíficos no funcionan para promover la señalización intracelular. De acuerdo con varias modalidades, los DBDpp-CARs biespecíficos muestran actividad aumentada (la magnitud de la señalización intracelular en el grupo de pb04-cg06 con células BDCM es mayor que lo que se puede justificar solo por el DBDpp de pb04 solo). De esta manera en varias modalidades, los DBDpp-CARs que comprenden dos DBDpps pueden cooperar para mejorar la función de células T. En varias modalidades, existe una sinergia entre los diversos DBDpp utilizados en un DBDpp-CAR biespecífico (u otro multimérico).

Ejemplo 16. Inmunoterapia para Tumores Mediada por DBDpp in Vivo

En varias modalidades, las células que expresan DBDpp-CAR son efectivas en la generación de citotoxicidad tumoral in vivo. Se realizarán experimentos en los cuales los DBDpp-CAR específicos para marcadores de cáncer son expresados sobre la superficie de células T (o en otros experimentos células NK). Se utilizará un modelo de ratón, en el cual los ratones son diseñados genéticamente para expresar un tumor sólido, o tumor en suspensión, en el cual las células tumorales expresan el marcador de cáncer al cual se dirigen los DBDpp-CARs específicos. Los ratones de control con tumor que no expresa el marcador fijado como objetivo se utilizarán como un control, como ratones que recibirán un producto terapéutico de células T placebo.

Las células DBDpp-CAR se administrarán a los ratones y la carga de tumor se evaluará a través del tiempo para los ratones que recibieron varios DBDpp-CAR. La carga de tumor se evaluará por medio de métodos establecidos (por ejemplo, imagenología in vivo) y la mortalidad se evaluará a través del tiempo.

Como resultado de la recepción de células DBDpp-CAR específicas para un objetivo, la carga del tumor se reducirá en ratones que expresan el marcador fijado como objetivo específicamente por los DBDpp. La reducción será significativa en comparación con aquellos ratones que recibieron un placebo. Del mismo modo, la reducción será significativa en comparación con aquellos ratones que tienen células tumorales que no expresan el marcador fijado como objetivo específicamente por los DBDpp. Además, la mortalidad se reducirá en ratones que reciben los DBDpp-CARs específicos para un objetivo en comparación con el grupo de placebo y el grupo de ratones con tumores que no expresan el marcador objetivo específico. Los resultados de este experimento demostrarán que las células inmunes que expresan DBDpp-CARs son agentes terapéuticos efectivos y generan citotoxicidad específica para un objetivo de

células tumorales in vivo.

Ejemplo 17: Inmunoterapia para Tumores Mediada por DBDpp In Vivo

Como se planteaba anteriormente, las células que expresan DBDpp-CAR son efectivas en la generación de citotoxicidad tumoral in vivo. Se realizarán experimentos en los cuales los DBDpp-CAR específicos para marcadores de cáncer son expresados sobre la superficie de células T (o en otros experimentos células NK). Los ensayos clínicos demostrarán la seguridad de las células DBDpp-CAR. Se realizarán ensayos adicionales para administrar las células DBDpp-CAR a humanos que tienen un tumor que expresa un marcador, al cual se dirigen específicamente los DBDpp.

Las células DBDpp-CAR se administrarán en un programa que se determina de acuerdo con la experiencia ordinaria en el campo. El progreso del tumor, la carga del tumor y la mortalidad se evaluarán a través del tiempo.

Como resultado de la recepción de células DBDpp-CAR específicas para un objetivo, se disminuirá la velocidad del progreso del tumor y la carga de tumor total se reducirá. La reducción será significativa en comparación con datos históricos utilizando técnicas anti-cáncer convencionales tales como quimioterapia o terapia de radiación. La mortalidad también disminuirá en comparación con estas terapias. Habrá efectos citotóxicos no específicos limitados. Los resultados de este ensayo demostrarán que las células inmunes que expresan DBDpp-CARs son agentes terapéuticos efectivos y generan citotoxicidad específica para un objetivo de células tumorales in vivo.

Ejemplo 18: Ensayo de Inhibición Competitiva para Definir la Especificidad por un Epítipo Objetivo de DBDpp Comparando Distintas Secuencias de Aminoácidos

Los DBDpp pueden ser definidos por varias propiedades estructurales y funcionales que incluyen, pero no están limitadas a, secuencia de aminoácidos primaria, pl, punto de fusión, especificidad por objetivos, afinidad de unión y especificidad por epítopos objetivo. La especificidad por epítopos objetivo de un primer DBDpp se puede comparar con aquella de un segundo DBDpp utilizando un formato de ensayo competitivo en el cual la unión de una concentración fija del primer DBDpp al objetivo se realiza en presencia de concentraciones crecientes del segundo DBDpp. Si el primer DBDpp y el segundo DBDpp se unen al mismo epítipo, o un epítipo parcialmente imbricado, como se define por la secuencia de aminoácidos o espacialmente, entonces el segundo DBDpp inhibirá (por ejemplo, competirá por) la unión del primer DBDpp al objetivo. Sin embargo si el segundo DBDpp no inhibe la unión del primer DBDpp, entonces el DBDpp se une a epítopos distintos. Este formato de ensayo se utilizó para evaluar la capacidad de un DBDpp que se une a PD-L1, pb04, para inhibir la unión de una concentración fija (11,1 pmoles/pocillo) de un segundo DBDpp que se une a PD-L1, pb06. La FIGURA 32 demuestra una inhibición dependiente de la concentración de pb06 marcado con FLAG soluble que se une a CF-PD-L1 por pb04 soluble con una concentración IC₅₀ de pb04 de 19 pmoles/pocillo. De esta manera, el pb04 y el pb06 exhiben unión a epítopos compartida aunque sus secuencias de aminoácidos primarias difieran (SEQ ID NO:182 y 184). Este formato de ensayo se adapta fácilmente para caracterizar la capacidad de un DBDpp para inhibir la unión de ligandos al objetivo del DBDpp.

Ejemplo 19: Generación y Selección de DBDpp que Fijan Como Objetivo el CD123

De acuerdo con varias modalidades de los métodos dados a conocer anteriormente, la secuencia de referencia de la SEQ ID NO:1 se modificó en una pluralidad de posiciones. En un experimento, las modificaciones dieron por resultado una colección de DBDpp que correspondía a la SEQ ID NO:6. Los ejemplos no limitantes de DBDpp que exhiben especificidad por CD123 son representados por las secuencias de las SEQ ID NOS: 60-69.

En un experimento adicional, las modificaciones dieron por resultado una colección de DBDpp que corresponde a la SEQ ID NO:2. Los ejemplos no limitantes del DBDpp que exhiben especificidad por CD123 son representados por las secuencias de las SEQ ID NOS: 70-91.

En un experimento adicional, las modificaciones dieron por resultado una colección de DBDpp que corresponde a la SEQ ID NO:4. Los ejemplos no limitantes de DBDpp que exhibe especificidad por CD123 son representados por las secuencias de las SEQ ID NOS: 92-127.

Dentro de cualquiera de las colecciones generadas de acuerdo con los métodos dados a conocer en este documento, cualquiera de las posiciones X_n en secuencias de una colección pueden ser sustituidas por un aminoácido natural o no natural, dependiendo de la modalidad. En algunas modalidades la cisteína y/o la prolina no se utilizan para estas sustituciones.

Ejemplo 20: Generación y Selección de DBDpp que Fijan Como Objetivo el CD123 Desinmunizado

De acuerdo con varias modalidades de los métodos dados a conocer anteriormente, la secuencia de referencia de la SEQ ID NO:1 se modificó en una pluralidad de posiciones. En un experimento, las modificaciones dieron por resultado una colección de DBDpp que correspondía a la SEQ ID NO:4. De acuerdo con los métodos dados a conocer en este documento, los miembros selectos de colecciones se identificaron y se desinmunizaron al identificar y modificar residuos potencialmente inmunógenos. En este experimento, el DBDpp de la SEQ ID NO:99 se modificó con una

sustitución S65E para producir la SEQ ID NO:130, que exhibía inmunogenicidad reducida.

Ejemplo 21: Desinmunización de DBDpp que Fijan Como Objetivo el CD123

Un DBDpp de la SEQ ID NO:99 se generó y se identificó de acuerdo con los métodos dados a conocer en este documento. Se hicieron modificaciones adicionales para reducir la inmunogenicidad potencial del DBDpp. En este experimento, una sustitución R17Q se hizo para producir el DBDpp de la SEQ ID NO:128. Adicionalmente, una sustitución S24E se hizo para producir el DBDpp de la SEQ ID NO:129. También, de acuerdo con varias modalidades, se pueden hacer múltiples sustituciones desinmunizantes. Por ejemplo, la SEQ ID NO:99 se modificó con (i) una sustitución R17Q, S24E para producir el DBDpp de la SEQ ID NO:131, (ii) una sustitución R17Q, S24T para producir el DBDpp de la SEQ ID NO:132, (iii) una sustitución R17Q, S24G para producir el DBDpp de la SEQ ID NO:133, (iv) una sustitución R17Q, S24E, S65E para producir el DBDpp de la SEQ ID NO:134, (v) una sustitución R17Q, S24T, S65E para producir el DBDpp de la SEQ ID NO:135 y una sustitución R17Q, S24G, S65E para producir el DBDpp de la SEQ ID NO:136.

Ejemplo 22: Generación y Selección de DBDpp que Fijan Como Objetivo el CD123

De acuerdo con varias modalidades de los métodos dados a conocer anteriormente, la secuencia de referencia de la SEQ ID NO:1 se modificó en una pluralidad de posiciones. En un experimento, las modificaciones dieron por resultado una colección de DBDpp que correspondía a la SEQ ID NO:6. Los ejemplos no limitantes de DBDpp que exhibía especificidad por CD19 son representados por la secuencia de la SEQ ID NO:137.

En un experimento adicional, las modificaciones dieron por resultado una colección de DBDpp que correspondía a la SEQ ID NO:4. Los ejemplos no limitantes de DBDpp que exhibían especificidad por CD19 son representados por las secuencias de las SEQ ID NOS:138-166.

Dentro de cualquiera de las colecciones generadas de acuerdo con los métodos dados a conocer en este documento, cualquiera de las posiciones X_n en secuencias de una colección pueden ser sustituidas por un aminoácido natural o no natural, dependiendo de la modalidad. En algunas modalidades la cisteína y/o prolina no se utilizan para estas sustituciones.

Ejemplo 23: Generación y Selección de DBDpp que Fijan Como Objetivo el CD22

De acuerdo con varias modalidades de los métodos dados a conocer anteriormente, la secuencia de referencia de la SEQ ID NO:1 se modificó en una pluralidad de posiciones. En un experimento, las modificaciones dieron por resultado una colección de DBDpp que corresponde a la SEQ ID NO:2. Los ejemplos no limitantes de DBDpp que exhiben especificidad por CD22 son representados por las secuencias de las SEQ ID NOS: 167-168.

En un experimento adicional, las modificaciones dieron por resultado una colección de DBDpp que corresponde a la SEQ ID NO:4. Los ejemplos no limitantes de DBDpp que exhiben especificidad por CD22 son representados por las secuencias de las SEQ ID NOS: 169-176.

Dentro de cualquiera de las colecciones generadas de acuerdo con los métodos dados a conocer en este documento, cualquiera de las posiciones X_n en secuencias de una colección pueden ser sustituidas por un aminoácido natural o no natural, dependiendo de la modalidad. En algunas modalidades la cisteína y/o prolina no se utilizan para estas sustituciones.

Ejemplo 24: Generación y Selección de DBDpp que Fijan Como Objetivo el DR5

De acuerdo con varias modalidades de los métodos dados a conocer anteriormente, la secuencia de referencia de la SEQ ID NO:1 se modificó en una pluralidad de posiciones. En un experimento, las modificaciones dieron por resultado una colección de DBDpp que corresponden a la SEQ ID NO:6. Los ejemplos no limitantes de DBDpp que exhiben especificidad por DR5 son representados por las secuencias de las SEQ ID NOS: 177-178.

En un experimento adicional, las modificaciones dieron por resultado una colección de DBDpp que corresponden a la SEQ ID NO:2. Los ejemplos no limitantes de DBDpp que exhiben especificidad por DR5 son representados por la secuencia de la SEQ ID NO:179.

En un experimento adicional, las modificaciones dieron por resultado una colección de DBDpp que corresponden a la SEQ ID NO:4. Los ejemplos no limitantes de DBDpp que exhiben especificidad por DR5 son representados por la secuencia de la SEQ ID NO:180.

Dentro de cualquiera de las colecciones generadas de acuerdo con los métodos dados a conocer en este documento, cualquiera de las posiciones X_n en secuencias de una colección puede ser sustituida por un aminoácido natural o no natural, dependiendo de la modalidad. En algunas modalidades la cisteína y/o prolina no se utilizan para estas sustituciones.

Ejemplo 25: Generación y Selección de DBDpp que Fijan Como Objetivo el PD-L1

De acuerdo con varias modalidades de los métodos dados a conocer anteriormente, la secuencia de referencia de la SEQ ID NO:1 se modificó en una pluralidad de posiciones. En un experimento, las modificaciones dieron por resultado una colección de DBDpp que corresponden a la SEQ ID NO:4. Los ejemplos no limitantes de DBDpp que exhiben especificidad por PD-L1 son representados por las secuencias de las SEQ ID NOS: 181-186.

Dentro de cualquiera de las colecciones generadas de acuerdo con los métodos dados a conocer en este documento, cualquiera de las posiciones X_n en secuencias de una colección pueden ser sustituidas por un aminoácido natural o no natural, dependiendo de la modalidad. En algunas modalidades la cisteína y/o prolina no se utilizan para estas sustituciones.

Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente, sitios de Internet y números de acceso/secuencias de bases de datos (inclusive secuencias tanto de polinucleótidos como de polipéptidos) citados se incorporan en este documento a manera de referencia en su totalidad para todos los fines al mismo grado como si cada publicación, patente, solicitud de patente, sitio de Internet o número de acceso/secuencia de base de datos individuales fuera indicada especial e individualmente para ser incorporada así a manera de referencia.

Se contempla que varias combinaciones o subcombinaciones de las cualidades y aspectos específicos de las modalidades dadas a conocer anteriormente se pueden hacer y aún pueden encontrarse dentro de una o más de las invenciones. Además, la descripción proporcionada en este documento de cualquier cualidad, aspecto, método, propiedad, característica, calidad, atributo, elemento particular o similares en relación con una modalidad se puede utilizar en todas las otras modalidades expuestas en este documento. Por consiguiente, se debe entender que varias cualidades y aspectos de las modalidades dadas a conocer se pueden combinar con o se pueden sustituir por otro con el propósito de formar modos variantes de las invenciones dadas a conocer. De esta manera, se pretende que el alcance de las presentes invenciones dadas a conocer en este documento no debe ser limitado por las modalidades particulares dadas a conocer que se describen anteriormente. Por otra parte, mientras que la invención es susceptible a varias modificaciones, y formas alternativas, los ejemplos específicos de las mismas han sido mostrados en los dibujos y se describen en detalle en este documento. Sin embargo, se debe entender que la invención no debe ser limitada a las formas o métodos particulares dados a conocer, sino por el contrario, la invención es para cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que se encuentran dentro del espíritu y alcance de las diversas modalidades descritas y las reivindicaciones anexas. Cualquier método dado a conocer en este documento no necesita ser realizado en el orden expuesto. Los métodos dados a conocer en este documento incluyen ciertas acciones tomadas por el practicante; sin embargo, también pueden incluir alguna instrucción de esas acciones por parte de terceros, ya sea expresamente o por implicación. Por ejemplo, las acciones tales como "administrar una célula T que comprende un DBDpp-CAR" incluyen "instruir la administración de una célula T que comprende un DBDpp-CAR". Además, donde las cualidades o aspectos de la descripción se exponen en términos de grupos de Markush, aquellas personas expertas en el campo reconocerán que la descripción también se expone en consecuencia en términos de algún miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

Los intervalos dados a conocer en este documento también comprenden cualquier o la totalidad de traslapes, sub-intervalos y combinaciones de los mismos. Expresiones tales como "hasta", "por lo menos", "mayor que", "menor que", "entre" y similares incluyen el número expuesto. Los números precedidos por un término tal como "aproximadamente" o "alrededor de" incluyen los números expuesto. Por ejemplo, "aproximadamente 10 nanómetros" incluye "10 nanómetros."

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Subdomain, LLC Arcellx, Inc. LaFleur, David W Hilbert, David M

<120> POLIPÉPTIDOS QUE CONTIENEN DOMINIOS DE UNIÓN DE NOVO Y USOS DE LOS MISMOS

<130> ENC.002WO

<140> Desconocido

<141> con la presente

<150> 62/143,772

<151> 06-04-2015

<160> 187

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 1

```

Met Gly Ser Trp Ala Glu Phe Lys Gln Arg Leu Ala Ala Ile Lys Thr
1           5           10           15

Arg Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
          20           25           30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
          35           40           45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
          50           55           60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65           70

```

10 <210> 2
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(6)
<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(10)
<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (16)..(17)
<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (30)..(30)
<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (33)..(34)
<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (37)..(37)
<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (40)..(41)
 5 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (44)..(44)
 10 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

<400> 2

Met	Gly	Ser	Trp	Xaa	Xaa	Phe	Lys	Xaa	Xaa	Leu	Ala	Xaa	Ile	Lys	Xaa	
1				5				10					15			
	Xaa	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Xaa	Phe	Glu
				20				25					30			
	Xaa	Xaa	Ile	Ala	Xaa	Phe	Glu	Xaa	Xaa	Leu	Gln	Xaa	Tyr	Lys	Gly	Lys
			35				40					45				
	Gly	Asn	Pro	Glu	Val	Glu	Ala	Leu	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Ile	Arg
	50					55					60					
	Asp	Glu	Leu	Gln	Ala	Tyr	Arg	His	Asn							
	65					70										

15 <210> 3
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (32)..(33)
 25 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (36)..(36)
 30 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (39)..(40)
 35 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (43)..(43)
 40 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (57)..(58)
 45 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

<220>
 <221> VARIANTE

<222> (61)..(61)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (64)..(65)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (68)..(68)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

15
 <400> 3

Met	Gly	Ser	Trp	Ala	Glu	Phe	Lys	Gln	Arg	Leu	Ala	Ala	Ile	Lys	Thr
1				5					10					15	
Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Phe	Xaa
			20					25					30		
Xaa	Glu	Ile	Xaa	Ala	Phe	Xaa	Xaa	Glu	Leu	Xaa	Ala	Tyr	Lys	Gly	Lys
		35					40					45			
Gly	Asn	Pro	Glu	Val	Glu	Ala	Leu	Xaa	Xaa	Glu	Ala	Xaa	Ala	Ile	Xaa
	50					55					60				
Xaa	Glu	Leu	Xaa	Ala	Tyr	Arg	His	Asn							
65					70										

<210> 4
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(9)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(16)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (55)..(55)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (58)..(59)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (62)..(62)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (65)..(66)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
 20
 <400> 4

 Met Gly Ser Trp Xaa Glu Phe Xaa Xaa Arg Leu Xaa Ala Ile Xaa Xaa
 1 5 10 15

 Arg Leu Xaa Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
 20 25 30

 Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
 35 40 45

 Gly Asn Pro Glu Val Glu Xaa Leu Arg Xaa Xaa Ala Ala Xaa Ile Arg
 50 55 60

 Xaa Xaa Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
 65 70
 25
 <210> 5
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
 35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(10)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
 40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
 45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)..(17)

	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural															
	<220>															
	<221> VARIANTE															
5	<222> (32)..(33)															
	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural															
	<220>															
	<221> VARIANTE															
10	<222> (36)..(36)															
	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural															
	<220>															
	<221> VARIANTE															
15	<222> (39)..(40)															
	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural															
	<220>															
	<221> VARIANTE															
20	<222> (43)..(43)															
	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural															
	<220>															
	<221> VARIANTE															
25	<222> (55)..(55)															
	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural															
	<220>															
	<221> VARIANTE															
30	<222> (58)..(59)															
	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural															
	<220>															
	<221> VARIANTE															
35	<222> (62)..(62)															
	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural															
	<220>															
	<221> VARIANTE															
40	<222> (65)..(66)															
	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural															
	<400> 5															
	Met	Gly	Ser	Trp	Xaa	Xaa	Phe	Lys	Xaa	Xaa	Leu	Ala	Xaa	Ile	Lys	Xaa
	1				5					10					15	
	Xaa	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Phe	Xaa
				20					25					30		
	Xaa	Glu	Ile	Xaa	Ala	Phe	Xaa	Xaa	Glu	Leu	Xaa	Ala	Tyr	Lys	Gly	Lys
			35					40					45			
	Gly	Asn	Pro	Glu	Val	Glu	Xaa	Leu	Arg	Xaa	Xaa	Ala	Ala	Xaa	Ile	Arg
				50				55					60			
	Xaa	Xaa	Leu	Gln	Ala	Tyr	Arg	His	Asn							
45																
	65							70								

	<210> 6
	<211> 73
	<212> PRT
	<213> <i>Homo sapiens</i>
5	
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (5)..(5)
10	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (8)..(9)
15	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (12)..(12)
20	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (15)..(16)
25	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (19)..(19)
30	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (30)..(30)
35	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (33)..(34)
40	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (37)..(37)
45	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (40)..(41)
50	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (44)..(44)
55	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (57)..(58)
60	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> (61)..(61)
65	<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>

<221> VARIANTE
<222> (64)..(65)
<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (68)..(68)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

10 <400> 6

Met	Gly	Ser	Trp	Xaa	Glu	Phe	Xaa	Xaa	Arg	Leu	Xaa	Ala	Ile	Xaa	Xaa	
1				5					10					15		
Arg	Leu	Xaa	Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Xaa	Phe	Glu	
			20					25					30			
Xaa	Xaa	Ile	Ala	Xaa	Phe	Glu	Xaa	Xaa	Leu	Gln	Xaa	Tyr	Lys	Gly	Lys	
		35					40					45				
Gly	Asn	Pro	Glu	Val	Glu	Ala	Leu	Xaa	Xaa	Glu	Ala	Xaa	Ala	Ile	Xaa	
			50						55					60		
			Xaa	Glu	Leu	Xaa	Ala	Tyr	Arg	His	Asn					
			65					70								

15 <210> 7
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(6)
<223> Xaa es cualquier aminoácido natural o no natural

25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(10)
<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (16)..(17)
<223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa es 20-30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales

45 <220>
 <221> VARIANTE

<222> (28)..(28)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (31)..(32)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (38)..(39)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (42)..(42)
 <223> Xaa es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural

25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (44)..(44)
 <223> Xaa es 20-30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales

30
 <400> 7

Met	Gly	Ser	Trp	Xaa	Xaa	Phe	Lys	Xaa	Xaa	Leu	Ala	Xaa	Ile	Lys	Xaa
1				5				10					15		
Xaa	Leu	Glu	Ala	Leu	Xaa	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Xaa	Phe	Glu	Xaa	Xaa
			20					25					30		
Ile	Ala	Xaa	Phe	Glu	Xaa	Xaa	Leu	Gln	Xaa	Tyr	Xaa	Asn	Pro	Glu	Val
			35				40					45			
Glu	Ala	Leu	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Ile	Arg	Asp	Glu	Leu	Gln	Ala
			50			55					60				
Tyr	Arg	His	Asn												
65															

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (37)..(38)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (41)..(41)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (44)..(44)
 <223> Xaa es 2-30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (52)..(53)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (56)..(56)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
 30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (59)..(60)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
 35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (63)..(63)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
 40
 <400> 8

 Met Gly Ser Trp Ala Glu Phe Lys Gln Arg Leu Ala Ala Ile Lys Thr
 1 5 10 15

 Arg Leu Glu Ala Leu Xaa Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Xaa Xaa Glu
 20 25 30

 Ile Xaa Ala Phe Xaa Xaa Glu Leu Xaa Ala Tyr Xaa Asn Pro Glu Val
 35 40 45

 Glu Ala Leu Xaa Xaa Glu Ala Xaa Ala Ile Xaa Xaa Glu Leu Xaa Ala
 50 55 60

 Tyr Arg His Asn
 65
 45
 <210> 9
 <211> 68
 <212> PRT

	<213> <i>Homo sapiens</i>
	<220>
	<221> VARIANTE
5	<222> (5)..(5)
	<223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
10	<222> (8)..(9)
	<223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
15	<222> (12)..(12)
	<223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
20	<222> (15)..(16)
	<223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
25	<222> (19)..(19)
	<223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
30	<222> (22)..(22)
	<223> Xaa es 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales
	<220>
	<221> VARIANTE
35	<222> (44)..(44)
	<223> Xaa es 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales
	<220>
	<221> VARIANTE
40	<222> (50)..(50)
	<223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
45	<222> (53)..(54)
	<223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
50	<222> (57)..(57)
	<223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
	<220>
	<221> VARIANTE
55	<222> (60)..(61)
	<223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
	<400> 9

Met	Gly	Ser	Trp	Xaa	Glu	Phe	Xaa	Xaa	Arg	Leu	Xaa	Ala	Ile	Xaa	Xaa
1				5					10					15	
Arg	Leu	Xaa	Ala	Leu	Xaa	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Phe	Glu	Lys	Glu
			20					25					30		
Ile	Ala	Ala	Phe	Glu	Ser	Glu	Leu	Gln	Ala	Tyr	Xaa	Asn	Pro	Glu	Val
			35				40					45			
Glu	Xaa	Leu	Arg	Xaa	Xaa	Ala	Ala	Xaa	Ile	Arg	Xaa	Xaa	Leu	Gln	Ala
	50					55					60				
Tyr	Arg	His	Asn												
65															

5	<210> 10 <211> 68 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>
10	<220> <221> VARIANTE <222> (5)..(6) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
15	<220> <221> VARIANTE <222> (9)..(10) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
20	<220> <221> VARIANTE <222> (13)..(13) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
25	<220> <221> VARIANTE <222> (16)..(17) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
30	<220> <221> VARIANTE <222> (22)..(22) <223> Xaa es 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales
35	<220> <221> VARIANTE <222> (30)..(31) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
40	<220> <221> VARIANTE <222> (34)..(34) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
45	<220> <221> VARIANTE <222> (37)..(38) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (41)..(41)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (44)..(44)
 <223> Xaa es 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (50)..(50)
 <223> Xaa un residuo de aminoácido natural y/o no natural
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (53)..(54)
 <223> Xaa un residuo de aminoácido natural y/o no natural
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (57)..(57)
 <223> Xaa un residuo de aminoácido natural y/o no natural
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (60)..(61)
 <223> Xaa un residuo de aminoácido natural y/o no natural
 30
 <400> 10

 Met Gly Ser Trp Xaa Xaa Phe Lys Xaa Xaa Leu Ala Xaa Ile Lys Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Leu Glu Ala Leu Xaa Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Xaa Xaa Glu
 20 25 30

 Ile Xaa Ala Phe Xaa Xaa Glu Leu Xaa Ala Tyr Xaa Asn Pro Glu Val
 35 40 45

 Glu Xaa Leu Arg Xaa Xaa Ala Ala Xaa Ile Arg Xaa Xaa Leu Gln Ala
 50 55 60

 Tyr Arg His Asn
 65

 35 <210> 11
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
 45 <220>
 <221> VARIANTE

	<222> (8)..(9)
	<223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
5	<220> <221> VARIANTE <222> (12)..(12) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
10	<220> <221> VARIANTE <222> (15)..(16) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
15	<220> <221> VARIANTE <222> (19)..(19) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
20	<220> <221> VARIANTE <222> (22)..(22) <223> Xaa es 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales
25	<220> <221> VARIANTE <222> (28)..(28) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
30	<220> <221> VARIANTE <222> (31)..(32) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
35	<220> <221> VARIANTE <222> (35)..(35) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
40	<220> <221> VARIANTE <222> (38)..(39) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
45	<220> <221> VARIANTE <222> (42)..(42) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
50	<220> <221> VARIANTE <222> (44)..(44) <223> Xaa es 2 a 30 residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales
55	<220> <221> VARIANTE <222> (52)..(53) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
60	<220> <221> VARIANTE <222> (56)..(56) <223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural
65	<220> <221> VARIANTE <222> (59)..(60)

<223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural

<220>

<221> VARIANTE

<222> (63)..(63)

<223> Xaa es un residuo de aminoácido natural o no natural

<400> 11

Met Gly Ser Trp Xaa Glu Phe Xaa Xaa Arg Leu Xaa Ala Ile Xaa Xaa
1 5 10 15

Arg Leu Xaa Ala Leu Xaa Glu Ala Glu Leu Ala Xaa Phe Glu Xaa Xaa
20 25 30

Ile Ala Xaa Phe Glu Xaa Xaa Leu Gln Xaa Tyr Xaa Asn Pro Glu Val
35 40 45

Glu Ala Leu Xaa Xaa Glu Ala Xaa Ala Ile Xaa Xaa Glu Leu Xaa Ala
50 55 60

Tyr Arg His Asn
65

<210> 12

<211> 73

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Met Gly Ser Trp Val Glu Phe Gly His Arg Leu Trp Ala Ile Asp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Lys Leu Arg Gln Arg Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Phe Arg Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 13

<211> 73

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Val Glu Phe Ala Asn Arg Leu Trp Ala Ile Asp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Phe Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu His Leu Arg Asp Gln Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

His Lys Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 14
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Arg His Arg Leu Trp Ala Ile Asp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Gly Leu Arg Glu Ala Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Ala Lys Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 15
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Ser Met Arg Leu Trp Ala Ile Asp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Ala Lys Ala Ala Tyr Ile Arg
50 55 60

Trp Lys Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 16
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Met Gly Ser Trp Phe Glu Phe Asn His Arg Leu Trp Ala Ile Asn Glu
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Arg Leu Arg Ser Met Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Tyr Lys Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 17
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Gly His Arg Leu Trp Ala Ile Asp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg Glu Thr Ala Ala His Ile Arg
50 55 60

Thr Arg Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 18
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe His Tyr Arg Leu His Ala Ile Asp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Glu Leu Arg Ile Lys Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Asp Arg Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 19
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Ala Glu Phe Lys Gln Arg Leu Ala Ala Ile Lys Thr
1 5 10 15

Arg Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Leu
20 25 30

Gly Glu Ile Trp Ala Phe Glu Met Glu Leu Ala Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Gly Arg Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Met Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 20
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 20

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Asp Leu Arg Leu His Ala Ile Tyr Asp
1 5 10 15

Arg Leu Val Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Arg Asp Asn Ala Ala Tyr Ile Arg
50 55 60

Gln Met Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 21
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 21

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Thr Glu Phe Thr Tyr Arg Leu Ser Ala Ile Glu Trp
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Trp Phe Glu
20 25 30

Gln Lys Ile Ala Phe Phe Glu Asp Phe Leu Gln Tyr Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Lys His Glu Ala Gly Ala Ile Leu
50 55 60

Asn Glu Leu Met Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 22
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Met Gly Ser Trp Ala Glu Phe Asp His Arg Leu His Ala Ile Arg Glu
1 5 10 15

Arg Leu His Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Arg Gly Asn Ala Ala Tyr Ile Arg
50 55 60

Ala Leu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 23
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Thr Glu Phe Val Gly Arg Leu Ala Ala Ile Glu Phe
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Trp Phe Glu
20 25 30

Ala His Ile Ala Phe Phe Glu Asp Tyr Leu Gln Trp Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Glu Glu Ala Gly Ala Ile Met
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 24
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

Met Gly Ser Trp Thr Glu Phe Tyr Ser Arg Leu Glu Ala Ile Trp Val
1 5 10 15

Arg Leu Gln Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Met Phe Glu
20 25 30

Asp Arg Ile Ala His Phe Glu Trp Phe Leu Gln Gln Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu His Glu Glu Ala Ile Ala Ile Arg
50 55 60

Lys Glu Leu Ala Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 25
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp His Glu Phe His Asp Arg Leu Gln Ala Ile His Glu
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ala His Ile Arg
50 55 60

Gln Val Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 26
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Met Gly Ser Trp Asn Tyr Phe Lys Asp His Leu Ala Trp Ile Lys Asn
1 5 10 15

Ser Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala His Phe Glu
20 25 30

Thr Ala Ile Ala Ser Phe Glu Arg Gln Leu Gln Glu Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 27
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Leu Tyr Phe Lys Glu His Leu Ala His Ile Lys Ala
1 5 10 15

Trp Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala His Phe Glu
20 25 30

Leu Ala Ile Ala Asp Phe Glu Tyr His Leu Gln Glu Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 28
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

Met Gly Ser Trp Val Tyr Phe Lys Glu His Leu Ala Trp Ile Lys Thr
1 5 10 15

Glu Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala His Phe Glu
20 25 30

His Ser Ile Ala Asp Phe Glu Met Ser Leu Gln Phe Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 29
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Phe Tyr Phe Lys Gln His Leu Ala Trp Ile Lys Ser
1 5 10 15

Tyr Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala His Phe Glu
20 25 30

Arg Ala Ile Ala Ala Phe Glu Gln His Leu Gln Met Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 30
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 30

Met Gly Ser Trp His Tyr Phe Lys Asp His Leu Ala Glu Ile Lys Gly
1 5 10 15

Leu Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala His Phe Glu
20 25 30

Met Ala Ile Ala Asp Phe Glu His Asn Leu Gln Tyr Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 31
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp His Tyr Phe Lys Gly His Leu Ala Glu Ile Lys Asn
1 5 10 15

His Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala His Phe Glu
20 25 30

Arg Ala Ile Ala Ala Phe Glu Arg Ser Leu Gln Trp Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 32
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 32

Met Gly Ser Trp Ile Tyr Phe Lys Glu His Leu Ala Tyr Ile Lys Lys
1 5 10 15

Glu Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala His Phe Glu
20 25 30

Ser Ala Ile Ala Val Phe Glu Ser Thr Leu Gln Tyr Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 33
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Thr Tyr Phe Lys Glu His Leu Ala Glu Ile Lys Tyr
1 5 10 15

Met Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala His Phe Glu
20 25 30

Val Ala Ile Ala Asp Phe Glu Lys Met Leu Gln Tyr Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 34
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

Met Gly Ser Trp Trp Leu Phe Lys Asp His Leu Ala Glu Ile Lys Thr
1 5 10 15

Ala Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala His Phe Glu
20 25 30

Met Ala Ile Ala Ala Phe Glu Lys Gln Leu Gln Tyr Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 35
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Ser Glu Phe Tyr Asn Arg Leu Asp Ala Ile Glu Ser
1 5 10 15

Arg Leu Leu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Leu Phe Glu
20 25 30

Ile Gln Ile Ala Arg Phe Glu Lys Val Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Gly Glu Ala Arg Ala Ile Phe
50 55 60

Ala Glu Leu Tyr Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 36
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 36

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Tyr Asn Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Ile
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Arg Leu Arg Val Arg Ala Ala Lys Ile Arg
50 55 60

Val Ile Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 37
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 37

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Leu Trp Phe Lys Ile Phe Leu Ala Glu Ile Lys Tyr
1 5 10 15

Phe Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Asp
20 25 30

Phe Glu Ile His Ala Phe His Val Glu Leu Phe Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Arg Glu Val Ala Ala Glu Ile Arg
50 55 60

Trp Asp Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 38
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 38

Met Gly Ser Trp Thr Glu Phe Gln Ser Arg Leu Asp Ala Ile His Ser
1 5 10 15

Arg Leu Arg Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Leu Leu Arg Asp Asp Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

His Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 39
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 39

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Gln Glu Phe Asp Asp Arg Leu Asn Ala Ile Lys Ala
1 5 10 15

Arg Leu Gln Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Asp Asp Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Arg Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 40
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Gln Asn Arg Leu His Ala Ile His Glu
1 5 10 15

Arg Leu Asn Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Leu Leu Arg Asp Asp Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

His Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 41
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 41

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Phe Glu Phe Gln Asp Arg Leu Thr Ala Ile Asn Glu
1 5 10 15

Arg Leu Ser Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Thr Leu Arg Ser Asp Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Arg Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 42
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 42

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Glu Ser Arg Leu Asp Ala Ile His Glu
1 5 10 15

Arg Leu His Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asn Leu Arg Gly Asp Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

His Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 43
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 43

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Asn His Arg Leu Asp Ala Ile Ser Lys
1 5 10 15

Arg Leu Asn Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Glu Leu Arg Gly Asp Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

His Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 44
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Met Gly Ser Trp Phe Glu Phe Glu Asn Arg Leu His Ala Ile Val His
1 5 10 15

Arg Leu Gly Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Thr Leu Arg Ala Asp Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

His Tyr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 45
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 45

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Val Val Phe Lys Val Asp Leu Ala Thr Ile Lys Tyr
1 5 10 15

Ile Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Glu Phe Glu
20 25 30

Gly Glu Ile Ala Gly Phe Glu Tyr Ser Leu Gln Phe Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 46
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 46

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

Asp Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Phe Phe Glu
20 25 30

Gly Trp Ile Ala Ser Phe Glu Met Glu Leu Gln Lys Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 47
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 47

ES 2 866 202 T3

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

His Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Phe Phe Glu
20 25 30

Gly Phe Ile Ala Ala Phe Glu Thr His Leu Gln Val Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 48
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

Met Gly Ser Trp Tyr Ala Phe Lys Asp Tyr Leu Ala Asp Ile Lys Gly
1 5 10 15

Trp Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Phe Phe Glu
20 25 30

Ile Phe Ile Ala Arg Phe Glu Leu Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 49
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 49

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Ala Glu Phe Lys Gln Arg Leu Ala Ala Ile Lys Thr
1 5 10 15

Arg Leu Gln Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 50

Leu Ala Ala Ile Lys Thr Arg Leu Gln
1 5

<210> 51
<211> 84
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 51

Met Gly Ser Trp Val Glu Phe Gly His Arg Leu Trp Ala Ile Asp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Lys Leu Arg Gln Arg Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Phe Arg Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn Gly Gly Gly Gly Ser His His
65 70 75 80

His His His His

<210> 52
<211> 84
<212> PRT

ES 2 866 202 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 52

Met Gly Ser Trp Val Glu Phe Ala Asn Arg Leu Trp Ala Ile Asp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Phe Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu His Leu Arg Asp Gln Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

His Lys Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn Gly Gly Gly Gly Ser His His
65 70 75 80

His His His His

5

<210> 53

<211> 84

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 53

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Arg His Arg Leu Trp Ala Ile Asp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Gly Leu Arg Glu Ala Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Ala Lys Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn Gly Gly Gly Gly Ser His His
65 70 75 80

His His His His

15

<210> 54

<211> 84

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 54

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Ser Met Arg Leu Trp Ala Ile Asp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Ala Lys Ala Ala Tyr Ile Arg
50 55 60

Trp Lys Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn Gly Gly Gly Gly Ser His His
65 70 75 80

His His His His

<210> 55
<211> 84
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 55

Met Gly Ser Trp Phe Glu Phe Asn His Arg Leu Trp Ala Ile Asn Glu
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Arg Leu Arg Ser Met Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Tyr Lys Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn Gly Gly Gly Gly Ser His His
65 70 75 80

His His His His

<210> 56
<211> 84
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 56

ES 2 866 202 T3

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Gly His Arg Leu Trp Ala Ile Asp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg Glu Thr Ala Ala His Ile Arg
50 55 60

Thr Arg Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn Gly Gly Gly Gly Ser His His
65 70 75 80

His His His His

<210> 57
<211> 84
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 57

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe His Tyr Arg Leu His Ala Ile Asp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Glu Leu Arg Ile Lys Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Asp Arg Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn Gly Gly Gly Gly Ser His His
65 70 75 80

His His His His

<210> 58
<211> 84
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 58

Met Gly Ser Trp Ala Glu Phe Lys Gln Arg Leu Ala Ala Ile Lys Thr
1 5 10 15

Arg Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Leu
20 25 30

Gly Glu Ile Trp Ala Phe Glu Met Glu Leu Ala Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Gly Arg Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Met Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn Gly Gly Gly Ser His His
65 70 75 80

His His His His

<210> 59
<211> 406
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 59

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

ES 2 866 202 T3

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

ES 2 866 202 T3

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
325 330 335

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
340 345 350

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
355 360 365

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
370 375 380

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390 395 400

His His His His His His
405

<210> 60
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 60

Met Gly Ser Trp Ile Glu Phe Glu Asp Arg Leu Asp Ala Ile Thr Asp
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Glu Phe Glu
20 25 30

His Gln Ile Ala Phe Phe Glu Glu Asp Leu Gln Trp Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu His Met Glu Ala Glu Ala Ile Met
50 55 60

Glu Glu Leu Gly Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 61
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 61

Met Gly Ser Trp Val Glu Phe Glu Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Ser Asp
1 5 10 15

ES 2 866 202 T3

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Phe Phe Glu
20 25 30

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

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Met Phe Glu Ala Glu Ala Ile Asp
50 55 60

Asp Glu Leu His Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 62
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 62

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Glu Asp Arg Leu Ala Ala Ile Glu Ala
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Asp Phe Glu
20 25 30

Glu Glu Ile Ala Tyr Phe Glu His Gly Leu Gln Trp Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Glu Ser Glu Ala Met Ala Ile Ile
50 55 60

Asp Glu Leu His Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 63
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 63

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Glu Glu Arg Leu Asp Ala Ile Glu Asp
1 5 10 15

Arg Leu Ile Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ile Phe Glu
20 25 30

Asp Ile Ile Ala Phe Phe Glu Gln Asp Leu Gln Tyr Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Glu Met Glu Ala Glu Ala Ile Ser
50 55 60

Ile Glu Leu Asp Ala Tyr Arg His Asn
65 70

5
<210> 64
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 64

Met Gly Ser Trp Trp Glu Phe Glu Asp Arg Leu Trp Ala Ile Asp Arg
1 5 10 15

Arg Leu Met Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Val Phe Glu
20 25 30

Gln Met Ile Ala His Phe Glu Gln Ile Leu Gln Val Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu His Phe Glu Ala His Ala Ile Gly
50 55 60

10 Met Glu Leu Ala Ala Tyr Arg His Asn
65 70

15
<210> 65
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 65

Met Gly Ser Trp Glu Glu Phe His Glu Arg Leu Asp Ala Ile Asp Glu
1 5 10 15

Arg Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Phe Phe Glu
20 25 30

Asp Asp Ile Ala Ser Phe Glu Asp Trp Leu Gln Trp Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Ser Arg Glu Ala Asp Ala Ile Asn
50 55 60

20 Phe Glu Leu Glu Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 66

<211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 66

Met Gly Ser Trp Glu Glu Phe Asp Lys Arg Leu Asp Ala Ile Thr Arg
 1 5 10 15

Arg Leu Met Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Glu Phe Glu
 20 25 30

Ser Thr Ile Ala Trp Phe Glu Trp Asp Leu Gln Glu Tyr Lys Gly Lys
 35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Asp Trp Glu Ala Tyr Ala Ile Asp
 50 55 60

Tyr Glu Leu Gly Ala Tyr Arg His Asn
 65 70

10 <210> 67
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 67

Met Gly Ser Trp Ser Glu Phe Val Asp Arg Leu Asp Ala Ile Phe Asp
 1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Trp Phe Glu
 20 25 30

Asp Thr Ile Ala His Phe Glu Trp Asn Leu Gln Glu Tyr Lys Gly Lys
 35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Asn Gly Glu Ala Asp Ala Ile Thr
 50 55 60

Asp Glu Leu His Ala Tyr Arg His Asn
 65 70

20 <210> 68
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 68

Met Gly Ser Trp Trp Glu Phe Thr Asp Arg Leu Asp Ala Ile Phe Asp
 1 5 10 15

25

ES 2 866 202 T3

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Glu Ser Ile Ala Ile Phe Glu Gln Asp Leu Gln Tyr Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Glu Tyr Glu Ala Asn Ala Ile Gln
50 55 60

Tyr Glu Leu Glu Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 69
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 69

Met Gly Ser Trp Trp Glu Phe Thr Asp Arg Leu Glu Ala Ile Glu Asp
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala His Phe Glu
20 25 30

Asp Ser Ile Ala Gln Phe Glu Gln Glu Leu Gln Trp Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Ala Asp Glu Ala Asp Ala Ile Glu
50 55 60

Ser Glu Leu His Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 70
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 70

Met Gly Ser Trp Glu Trp Phe Lys Ser Asp Leu Ala Ser Ile Lys Trp
1 5 10 15

Glu Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Trp Phe Glu
20 25 30

His Asp Ile Ala Glu Phe Glu Glu Asp Leu Gln Trp Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

ES 2 866 202 T3

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 71
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 71

Met Gly Ser Trp Asp His Phe Lys Asn Asp Leu Ala Trp Ile Lys Lys
1 5 10 15

His Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Glu Phe Glu
20 25 30

Ala Val Ile Ala Tyr Phe Glu Leu Tyr Leu Gln Gly Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 72
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 72

Met Gly Ser Trp Glu Phe Phe Lys Glu Val Leu Ala Glu Ile Lys Tyr
1 5 10 15

Asp Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Trp Phe Glu
20 25 30

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

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 73

<211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 73

Met Gly Ser Trp Tyr Asp Phe Lys Glu Asp Leu Ala Asp Ile Lys Trp
 1 5 10 15

Met Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Glu Phe Glu
 20 25 30

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

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
 50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
 65 70

10 <210> 74
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 74

Met Gly Ser Trp Ser Phe Phe Lys Asp Asp Leu Ala Glu Ile Lys Tyr
 1 5 10 15

Phe Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Met Phe Glu
 20 25 30

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

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
 50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
 65 70

20 <210> 75
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 75

25 Met Gly Ser Trp Val Thr Phe Lys Asp Glu Leu Ala Asp Ile Lys Asp
 1 5 10 15

ES 2 866 202 T3

Phe Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Phe Phe Glu
20 25 30

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

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 76
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 76

Met Gly Ser Trp Ser Trp Phe Lys Glu Asp Leu Ala Asp Ile Lys Phe
1 5 10 15

Glu Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Trp Phe Glu
20 25 30

Leu Asp Ile Ala Asp Phe Glu Gln Ala Leu Gln Gln Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 77
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 77

Met Gly Ser Trp Trp Glu Phe Lys Glu Asp Leu Ala Glu Ile Lys Trp
1 5 10 15

Phe Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Trp Phe Glu
20 25 30

His Asp Ile Ala Lys Phe Glu Phe Glu Leu Gln Tyr Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

ES 2 866 202 T3

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 78
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 78

Met Gly Ser Trp Asp Glu Phe Lys Glu Asp Leu Ala His Ile Lys Thr
1 5 10 15

Asp Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Leu Phe Glu
20 25 30

Asp Glu Ile Ala Asp Phe Glu Met Tyr Leu Gln His Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 79
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 79

Met Gly Ser Trp Phe Met Phe Lys Glu Glu Leu Ala Asp Ile Lys Asp
1 5 10 15

Trp Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ser Phe Glu
20 25 30

Ser Tyr Ile Ala Trp Phe Glu Gln Asp Leu Gln Trp Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 80

<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 80

Met	Gly	Ser	Trp	Gln	Ile	Phe	Lys	Gly	Glu	Leu	Ala	Tyr	Ile	Lys	Gln
1				5					10					15	
Tyr	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Phe	Phe	Glu
			20					25					30		
Phe	Asp	Ile	Ala	Glu	Phe	Glu	Glu	Asp	Leu	Gln	Tyr	Tyr	Lys	Gly	Lys
		35					40					45			
Gly	Asn	Pro	Glu	Val	Glu	Ala	Leu	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Ile	Arg
	50					55					60				
Asp	Glu	Leu	Gln	Ala	Tyr	Arg	His	Asn							
65						70									

<210> 81
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 81

15

Met	Gly	Ser	Trp	Tyr	Ile	Phe	Lys	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Ile	Lys	Glu
1				5					10					15	
Glu	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Tyr	Phe	Glu
			20					25					30		
Glu	Glu	Ile	Ala	Leu	Phe	Glu	Met	Glu	Leu	Gln	Trp	Tyr	Lys	Gly	Lys
		35					40					45			
Gly	Asn	Pro	Glu	Val	Glu	Ala	Leu	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Ile	Arg
	50					55					60				
Asp	Glu	Leu	Gln	Ala	Tyr	Arg	His	Asn							
65						70									

<210> 82
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 82

25

Met	Gly	Ser	Trp	Tyr	Tyr	Phe	Lys	Asp	Glu	Leu	Ala	Asp	Ile	Lys	Trp
1				5					10					15	

ES 2 866 202 T3

Asp Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Trp Phe Glu
20 25 30

Met Leu Ile Ala Gln Phe Glu Leu Asp Leu Gln Trp Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 83
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 83

Met Gly Ser Trp Phe Asn Phe Lys Glu Glu Leu Ala Val Ile Lys Phe
1 5 10 15

Gln Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Phe Phe Glu
20 25 30

Trp Val Ile Ala Asp Phe Glu Asp Asp Leu Gln Glu Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 84
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 84

Met Gly Ser Trp Tyr Met Phe Lys Glu Glu Leu Ala Asp Ile Lys Trp
1 5 10 15

Tyr Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Trp Phe Glu
20 25 30

Asp Asp Ile Ala Gly Phe Glu Trp Asp Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

ES 2 866 202 T3

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 85
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 85

Met Gly Ser Trp His Val Phe Lys Thr Glu Leu Ala Asp Ile Lys Phe
1 5 10 15

Tyr Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Met Phe Glu
20 25 30

Leu Trp Ile Ala Glu Phe Glu His Glu Leu Gln Asp Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 86
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 86

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

Phe Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Trp Phe Glu
20 25 30

Asp Asp Ile Ala Glu Phe Glu Thr Gln Leu Gln His Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 87

<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 87

```

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

Ile Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Phe Phe Glu
                20           25           30

Asp Glu Ile Ala Ala Phe Glu Trp Asp Leu Gln Lys Tyr Lys Gly Lys
          35           40           45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
      50           55           60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65           70

```

<210> 88
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 88

15

```

Met Gly Ser Trp Phe Trp Phe Lys Glu Asp Leu Ala Phe Ile Lys Glu
1           5           10           15

Asp Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Trp Phe Glu
          20           25           30

Asp Gly Ile Ala Phe Phe Glu Trp Asp Leu Gln Asp Tyr Lys Gly Lys
          35           40           45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
      50           55           60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65           70

```

<210> 89
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 89

25

```

Met Gly Ser Trp Ser Trp Phe Lys Glu Asp Leu Ala Ser Ile Lys Ala
1           5           10           15

```

ES 2 866 202 T3

Val Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Phe Phe Glu
20 25 30

Ser Asp Ile Ala Glu Phe Glu Gln Glu Leu Gln Tyr Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 90
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 90

Met Gly Ser Trp Ile Leu Phe Lys Asp Asp Leu Ala Trp Ile Lys Glu
1 5 10 15

Thr Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Phe Phe Glu
20 25 30

Asp Asn Ile Ala Asp Phe Glu Glu Gln Leu Gln Gly Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 91
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 91

Met Gly Ser Trp Gln Trp Phe Lys Asp Asp Leu Ala Tyr Ile Lys Glu
1 5 10 15

Thr Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Leu Phe Glu
20 25 30

Asp Met Ile Ala Asp Phe Glu Phe Glu Leu Gln Trp Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 92
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 92

Met Gly Ser Trp Glu Glu Phe His Ser Arg Leu Asp Ala Ile Asp Asp
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Trp Glu Ala Ala Thr Ile Arg
50 55 60

Glu Thr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 93
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 93

Met Gly Ser Trp Ser Glu Phe Trp Gln Arg Leu Glu Ala Ile Glu Asp
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Glu Asn Ala Ala Met Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 94

ES 2 866 202 T3

<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 94

```

Met Gly Ser Trp Thr Glu Phe Ala Trp Arg Leu Asp Ala Ile Tyr Asp
1           5           10           15

Arg Leu Leu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
          20           25           30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
          35           40           45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg His Val Ala Ala Asn Ile Arg
          50           55           60

Arg Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65           70

```

10 <210> 95
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 95

```

Met Gly Ser Trp Asp Glu Phe Tyr Tyr Arg Leu Glu Ala Ile Glu Met
1           5           10           15

Arg Leu Gly Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
          20           25           30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
          35           40           45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Glu Leu Arg His Tyr Ala Ala Gln Ile Arg
          50           55           60

His Met Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65           70

```

20 <210> 96
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 96

```

Met Gly Ser Trp Ile Glu Phe Asn Met Arg Leu Asp Ala Ile Tyr Glu
1           5           10           15

```

25

ES 2 866 202 T3

Arg Leu Val Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Lys Val Ala Ala Asn Ile Arg
50 55 60

Leu Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 97
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 97

Met Gly Ser Trp Ser Glu Phe Asn Met Arg Leu Asp Ala Ile Tyr Glu
1 5 10 15

Arg Leu Thr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg His Ser Ala Ala Arg Ile Arg
50 55 60

Leu Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 98
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 98

Met Gly Ser Trp Val Glu Phe Asn Ile Arg Leu Asp Ala Ile Tyr Glu
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Lys Leu Arg His Trp Ala Ala Ser Ile Arg
50 55 60

Arg Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 99
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 99

Met Gly Ser Trp Asp Glu Phe Gly Arg Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Trp
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Lys Leu Arg Glu Ile Ala Ala Val Ile Arg
50 55 60

Ser Asn Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 100
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 100

Met Gly Ser Trp Ile Glu Phe Tyr Asp Arg Leu Glu Ala Ile Tyr Asp
1 5 10 15

Arg Leu Asp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Glu Asp Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Ser Trp Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 101
<211> 73

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 101

5

```

Met Gly Ser Trp Thr Glu Phe Asp Arg Arg Leu Asp Ala Ile Trp Asp
1           5           10           15

Arg Leu Phe Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
                20           25           30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
                35           40           45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Glu Glu Ala Ala Asp Ile Arg
    50           55           60

Asp Tyr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65           70

```

<210> 102
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 102

```

Met Gly Ser Trp Thr Glu Phe Asp Arg Arg Leu Asp Ala Ile Trp Asp
1           5           10           15

Arg Leu Phe Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
                20           25           30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
                35           40           45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Glu Glu Ala Ala Asp Ile Arg
    50           55           60

Asp Tyr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65           70

```

15

<210> 103
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 103

```

Met Gly Ser Trp Ile Glu Phe Glu Val Arg Leu Asp Ala Ile Tyr Asn
1           5           10           15

```

25

ES 2 866 202 T3

Arg Leu Ala Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Tyr Ala Ala Asn Ile Arg
50 55 60

His Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 104
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 104

Met Gly Ser Trp Thr Glu Phe His Asp Arg Leu Glu Ala Ile Asp Asp
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg Glu Glu Ala Ala Gln Ile Arg
50 55 60

Trp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 105
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 105

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe His His Arg Leu Asp Ala Ile Tyr Glu
1 5 10 15

Arg Leu Leu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

ES 2 866 202 T3

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Ser Ser Ala Ala Asn Ile Arg
50 55 60

Lys Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 106
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 106

Met Gly Ser Trp His Glu Phe Asp Gln Arg Leu Trp Ala Ile Glu Glu
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Thr Leu Arg Leu Tyr Ala Ala Leu Ile Arg
50 55 60

His Asp Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 107
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 107

Met Gly Ser Trp Ile Glu Phe Glu Ser Arg Leu Trp Ala Ile Glu Asp
1 5 10 15

Arg Leu Leu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Phe Leu Arg Leu Glu Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

Glu Asp Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 108

<211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 108

```

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Glu Asn Arg Leu Gly Ala Ile Gly Asp
1           5           10           15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
          20           25           30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
          35           40           45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Asp Glu Ala Ala Tyr Ile Arg
          50           55           60

Ala Val Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65           70

```

10 <210> 109
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 109

```

Met Gly Ser Trp Asn Glu Phe Tyr Asp Arg Leu Ser Ala Ile Tyr Phe
1           5           10           15

Arg Leu Gln Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
          20           25           30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
          35           40           45

Gly Asn Pro Glu Val Glu His Leu Arg Trp Tyr Ala Ala Asp Ile Arg
          50           55           60

Met Ile Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65           70

```

20 <210> 110
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 110

25 Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Glu Tyr Arg Leu Glu Ala Ile Glu Asp
 1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg Glu Glu Ala Ala Trp Ile Arg
50 55 60

Val Trp Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 111
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 111

Met Gly Ser Trp Val Glu Phe Glu Asn Arg Leu Glu Ala Ile Glu Asn
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Glu Asp Ala Ala Gln Ile Arg
50 55 60

Met Met Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 112
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 112

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Trp Asp Arg Leu Glu Ala Ile Asp Asp
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

ES 2 866 202 T3

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Gln Glu Ala Ala Trp Ile Arg
50 55 60

Glu Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 113
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 113

Met Gly Ser Trp Phe Glu Phe Trp Asp Arg Leu Asp Ala Ile Glu Asp
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Glu Leu Arg Asp Glu Ala Ala Trp Ile Arg
50 55 60

Gly Thr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 114
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 114

Met Gly Ser Trp Thr Glu Phe Asp Arg Arg Leu Asp Ala Ile Trp Asp
1 5 10 15

Arg Leu Phe Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Glu Glu Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

Asp Tyr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 115

<211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 115

```

Met Gly Ser Trp Trp Glu Phe Glu Met Arg Leu Glu Ala Ile Glu Asp
 1              5              10              15

Arg Leu Phe Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
              20              25              30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
              35              40              45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ser Leu Arg Trp Glu Ala Ala Phe Ile Arg
 50              55              60

Asp Ile Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65              70

```

10 <210> 116
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 116

```

Met Gly Ser Trp Val Glu Phe Tyr Asp Arg Leu His Ala Ile Tyr Phe
 1              5              10              15

Arg Leu Leu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
              20              25              30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
              35              40              45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Trp Tyr Ala Ala Asp Ile Arg
 50              55              60

Leu Val Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65              70

```

20 <210> 117
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 117

```

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Tyr Asn Arg Leu Ser Ala Ile Tyr Ala
 1              5              10              15

```


ES 2 866 202 T3

Arg Leu Gln Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Trp Tyr Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

Tyr Met Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 118
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 118

Met Gly Ser Trp Phe Glu Phe Trp Gly Arg Leu Glu Ala Ile Glu Ser
1 5 10 15

Arg Leu Lys Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Glu Leu Arg Glu His Ala Ala Trp Ile Arg
50 55 60

Ala Tyr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 119
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 119

Met Gly Ser Trp Thr Glu Phe Ser Ile Arg Leu Glu Ala Ile Tyr Asp
1 5 10 15

Arg Leu Val Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Arg Thr Tyr Ala Ala Asn Ile Arg
50 55 60

His Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 120
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 120

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Glu Asn Arg Leu Glu Ala Ile Glu Glu
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Met Leu Arg Glu Glu Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Asp Trp Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 121
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 121

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Val Ile Arg Leu Glu Ala Ile Glu Asp
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Arg Trp Tyr Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

His Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 122

<211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 122

Met Gly Ser Trp Ile Glu Phe Glu Asp Arg Leu Glu Ala Ile Glu Asp
 1 5 10 15

Arg Leu Phe Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
 20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
 35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Gln Glu Ala Ala Glu Ile Arg
 50 55 60

Leu Met Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
 65 70

10 <210> 123
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 123

Met Gly Ser Trp Thr Glu Phe Asn Leu Arg Leu Asp Ala Ile Tyr Asp
 1 5 10 15

Arg Leu Met Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
 20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
 35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Ala Ser Ala Ala Ala Ile Arg
 50 55 60

Val Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
 65 70

20 <210> 124
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 124

25 Met Gly Ser Trp Ser Glu Phe Tyr Leu Arg Leu Asp Ala Ile Tyr Asp
 1 5 10 15

ES 2 866 202 T3

Arg Leu Asp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Lys Thr Ala Ala Asn Ile Arg
50 55 60

Glu Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 125
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 125

Met Gly Ser Trp Ser Glu Phe His Val Arg Leu Asp Ala Ile Tyr Ala
1 5 10 15

Arg Leu Asp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Arg Leu Arg Glu Trp Ala Ala Asn Ile Arg
50 55 60

Arg Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 126
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 126

Met Gly Ser Trp His Glu Phe Gly Val Arg Leu Asp Ala Ile Tyr Asp
1 5 10 15

Arg Leu Met Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

ES 2 866 202 T3

Gly Asn Pro Glu Val Glu Phe Leu Arg Gln Ala Ala Ala Asn Ile Arg
50 55 60

Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 127
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 127

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Ser Met Arg Leu Asp Ala Ile Tyr Asp
1 5 10 15

Arg Leu Met Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Gln Leu Arg Gly Tyr Ala Ala Asn Ile Arg
50 55 60

Asn Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 128
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 128

Met Gly Ser Trp Asp Glu Phe Gly Arg Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Trp
1 5 10 15

Gln Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Lys Leu Arg Glu Ile Ala Ala Val Ile Arg
50 55 60

Ser Asn Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 129
<211> 73

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 129

5

Met Gly Ser Trp Asp Glu Phe Gly Arg Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Trp
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Glu Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Lys Leu Arg Glu Ile Ala Ala Val Ile Arg
50 55 60

Ser Asn Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 130
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 130

10

Met Gly Ser Trp Asp Glu Phe Gly Arg Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Trp
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Lys Leu Arg Glu Ile Ala Ala Val Ile Arg
50 55 60

Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

15

<210> 131
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 131

20

Met Gly Ser Trp Asp Glu Phe Gly Arg Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Trp
1 5 10 15

25

ES 2 866 202 T3

Gln Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Glu Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Lys Leu Arg Glu Ile Ala Ala Val Ile Arg
50 55 60

Ser Asn Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 132
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 132

Met Gly Ser Trp Asp Glu Phe Gly Arg Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Trp
1 5 10 15

Gln Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Thr Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Lys Leu Arg Glu Ile Ala Ala Val Ile Arg
50 55 60

Ser Asn Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 133
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 133

Met Gly Ser Trp Asp Glu Phe Gly Arg Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Trp
1 5 10 15

Gln Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Gly Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

ES 2 866 202 T3

Gly Asn Pro Glu Val Glu Lys Leu Arg Glu Ile Ala Ala Val Ile Arg
50 55 60

Ser Asn Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 134
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 134

Met Gly Ser Trp Asp Glu Phe Gly Arg Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Trp
1 5 10 15

Gln Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Glu Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Lys Leu Arg Glu Ile Ala Ala Val Ile Arg
50 55 60

Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 135
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 135

Met Gly Ser Trp Asp Glu Phe Gly Arg Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Trp
1 5 10 15

Gln Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Thr Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Lys Leu Arg Glu Ile Ala Ala Val Ile Arg
50 55 60

Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 136
<211> 73

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 136

5

Met Gly Ser Trp Asp Glu Phe Gly Arg Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Trp
1 5 10 15

Gln Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Gly Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Lys Leu Arg Glu Ile Ala Ala Val Ile Arg
50 55 60

Glu Asn Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 137
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 137

Met Gly Ser Trp Glu Glu Phe Glu Leu Arg Leu Asn Ala Ile Glu Glu
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Tyr Phe Glu
20 25 30

Tyr Val Ile Ala Asp Phe Glu Gly Asn Leu Gln Arg Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Tyr Phe Glu Ala Asp Ala Ile Phe
50 55 60

Glu Glu Leu Val Ala Tyr Arg His Asn
65 70

15

<210> 138
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 138

Met Gly Ser Trp Phe Glu Phe Asn His Arg Leu Trp Ala Ile Phe Glu
1 5 10 15

25

ES 2 866 202 T3

Arg Leu Met Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg Ala Met Ala Ala Val Ile Arg
50 55 60

Tyr His Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 139
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 139

Met Gly Ser Trp Glu Glu Phe Asp Gly Arg Leu Phe Ala Ile Glu Gln
1 5 10 15

Arg Leu Gln Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Arg Trp Phe Ala Ala Gly Ile Arg
50 55 60

Asp Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 140
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 140

Met Gly Ser Trp Ala Glu Phe Tyr His Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Thr
1 5 10 15

Arg Leu Ser Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

ES 2 866 202 T3

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg His Trp Ala Ala Trp Ile Arg
50 55 60

Thr Tyr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 141
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 141

Met Gly Ser Trp Val Glu Phe Ser Asp Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Glu
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Glu Leu Arg Glu Leu Ala Ala Ile Ile Arg
50 55 60

His Ser Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 142
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 142

Met Gly Ser Trp Trp Glu Phe Glu Gly Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Glu
1 5 10 15

Arg Leu Thr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg Glu Trp Ala Ala Trp Ile Arg
50 55 60

Gln Met Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 143
<211> 73

ES 2 866 202 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 143

5

Met Gly Ser Trp Trp Glu Phe Glu His Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Glu
1 5 10 15

Arg Leu Val Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg Asn Trp Ala Ala Tyr Ile Arg
50 55 60

Met Ala Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 144
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 144

Met Gly Ser Trp Trp Glu Phe Glu Ala Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Phe
1 5 10 15

Arg Leu Ser Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg Ser Trp Ala Ala Tyr Ile Arg
50 55 60

Thr Ser Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

15

<210> 145
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 145

Met Gly Ser Trp Trp Glu Phe Glu Ala Arg Leu Trp Ala Ile Glu Ser
1 5 10 15

25

ES 2 866 202 T3

Arg Leu Lys Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg His Trp Ala Ala Tyr Ile Arg
50 55 60

Val Ile Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 146
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 146

Met Gly Ser Trp Trp Glu Phe Glu Ala Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Phe
1 5 10 15

Arg Leu Ser Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg Ser Trp Ala Ala Tyr Ile Arg
50 55 60

Thr Ser Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 147
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 147

Met Gly Ser Trp Glu Glu Phe Tyr His Arg Leu Asp Ala Ile Glu Leu
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg Trp Tyr Ala Ala Glu Ile Arg
50 55 60

Glu Ile Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 148
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 148

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Tyr Glu Arg Leu Asp Ala Ile Asp Thr
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Phe Leu Arg Glu Tyr Ala Ala Glu Ile Arg
50 55 60

His Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 149
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 149

Met Gly Ser Trp Asn Glu Phe Phe Asp Arg Leu Asp Ala Ile Leu Tyr
1 5 10 15

Arg Leu Asp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg Phe Val Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

Ser Trp Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 150

ES 2 866 202 T3

<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 150

```

Met Gly Ser Trp Ile Glu Phe Asp Asp Arg Leu Leu Ala Ile Met Asp
 1              5              10              15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
      20              25              30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
      35              40              45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Asp Val Ala Ala Asp Ile Arg
      50              55              60

His Tyr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65              70

```

10 <210> 151
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 151

```

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Trp Glu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Phe
 1              5              10              15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
      20              25              30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
      35              40              45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Thr Trp Ala Ala Asp Ile Arg
      50              55              60

Ala Ile Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65              70

```

20 <210> 152
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 152

```

Met Gly Ser Trp Glu Glu Phe Tyr Ile Arg Leu Asp Ala Ile Met Glu
 1              5              10              15

```

ES 2 866 202 T3

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Tyr Ala Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

His Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 153
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 153

Met Gly Ser Trp Ile Glu Phe Glu Glu Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Thr
1 5 10 15

Arg Leu Leu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Phe Leu Arg Val Val Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

Glu Trp Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 154
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 154

Met Gly Ser Trp Ile Glu Phe Glu His Arg Leu Ser Ala Ile Asn Asp
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

ES 2 866 202 T3

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Glu Trp Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

Ser Leu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 155
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 155

Met Gly Ser Trp Phe Glu Phe Glu Met Arg Leu Asp Ala Ile Met Ala
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Tyr Ala Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

Asp Tyr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 156
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 156

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Val Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Tyr Asp
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Tyr Ala Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

Asp Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 157

<211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 157

Met Gly Ser Trp Val Glu Phe Glu Asp Arg Leu Asp Ala Ile Leu Glu
 1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
 20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
 35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Glu Leu Ala Ala Asp Ile Arg
 50 55 60

Asp Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
 65 70

10 <210> 158
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 158

Met Gly Ser Trp Phe Glu Phe Glu Glu Arg Leu Ile Ala Ile Glu Glu
 1 5 10 15

Arg Leu Phe Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
 20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
 35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Tyr Leu Arg Trp Ile Ala Ala Asp Ile Arg
 50 55 60

Asp Val Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
 65 70

20 <210> 159
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 159

25 Met Gly Ser Trp Ile Glu Phe Ala Asp Arg Leu Asp Ala Ile Leu Asp
 1 5 10 15

Arg Leu Asp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Glu Ile Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

Ala Tyr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 160
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 160

Met Gly Ser Trp Leu Glu Phe Glu Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Leu Asp
1 5 10 15

Arg Leu Phe Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Glu Val Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

Met Leu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 161
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 161

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe His Asp Arg Leu Asp Ala Ile Thr Asn
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

ES 2 866 202 T3

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Asp Trp Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

Val Trp Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 162
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 162

Met Gly Ser Trp Gln Glu Phe Glu Gln Arg Leu Asp Ala Ile Asn Trp
1 5 10 15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Glu Leu Arg Glu Trp Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

Ile Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 163
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 163

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Tyr Ser Arg Leu Asp Ala Ile Asp Ser
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Phe Leu Arg Asp Tyr Ala Ala Glu Ile Arg
50 55 60

Arg Tyr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 164
<211> 73

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 164

5

```

Met Gly Ser Trp Glu Glu Phe His Asp Arg Leu Glu Ala Ile Ser Asp
 1           5           10           15

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
          20           25           30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
          35           40           45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Asp Trp Ala Ala Asp Ile Arg
 50           55           60

Phe Tyr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65           70

```

<210> 165
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 165

10

```

Met Gly Ser Trp Trp Glu Phe Asp Glu Arg Leu Tyr Ala Ile Glu Asp
 1           5           10           15

Arg Leu Phe Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
          20           25           30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
          35           40           45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Trp Leu Arg Ile Val Ala Ala Asp Ile Arg
 50           55           60

Glu Ile Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65           70

```

15

<210> 166
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 166

20

```

Met Gly Ser Trp Glu Glu Phe Glu Tyr Arg Leu Met Ala Ile Glu Val
 1           5           10           15

```

25

ES 2 866 202 T3

Arg Leu Trp Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Arg Glu Ile Ala Ala Asp Ile Arg
50 55 60

Gln Ile Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 167
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 167

Met Gly Ser Trp Val Val Phe Lys Gln Arg Leu Ala Tyr Ile Lys Asp
1 5 10 15

Leu Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Tyr Phe Glu
20 25 30

Met Ser Ile Ala Phe Phe Glu Glu Asp Leu Gln Val Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 168
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 168

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Lys Asn Asp Leu Ala Trp Ile Lys Val
1 5 10 15

His Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Tyr Phe Glu
20 25 30

Phe Arg Ile Ala His Phe Glu Asn Ala Leu Gln Tyr Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

ES 2 866 202 T3

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
50 55 60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

5
<210> 169
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 169

Met Gly Ser Trp Val Glu Phe Tyr Asn Arg Leu Trp Ala Ile Asp His
1 5 10 15

Arg Leu His Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Arg Tyr His Ala Ala Ser Ile Arg
50 55 60

10 Val Thr Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

15
<210> 170
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 170

Met Gly Ser Trp Ser Glu Phe Tyr Asp Arg Leu His Ala Ile His His
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Asp Thr Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

20 Thr Arg Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 171

<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 171

Met Gly Ser Trp Lys Glu Phe His Phe Arg Leu His Ala Ile Glu His
1 5 10 15

Arg Leu Ile Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Phe Leu Arg Ala Lys Ala Ala Asn Ile Arg
50 55 60

Thr His Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

10 <210> 172
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 172

Met Gly Ser Trp Phe Glu Phe His Gly Arg Leu His Ala Ile Tyr Gly
1 5 10 15

Arg Leu Ser Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu His Leu Arg Ala His Ala Ala His Ile Arg
50 55 60

Asp His Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

20 <210> 173
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 173

25 Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Ala Asp Arg Leu His Ala Ile His Gln
1 5 10 15

ES 2 866 202 T3

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Met Thr Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Ser Arg Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 174
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 174

Met Gly Ser Trp Asn Glu Phe Tyr Asn Arg Leu His Ala Ile His Gln
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ser Leu Arg Gln Thr Ala Ala Tyr Ile Arg
50 55 60

Asp Arg Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 175
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 175

Met Gly Ser Trp Asn Glu Phe Ala Asp Arg Leu His Ala Ile His Gln
1 5 10 15

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

ES 2 866 202 T3

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ser Leu Arg Met Thr Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Ser Arg Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

5
<210> 176
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 176

Met Gly Ser Trp Thr Glu Phe Ser Tyr Arg Leu Gly Ala Ile Gln Ser
1 5 10 15

Arg Leu His Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu His Leu Arg Tyr Asn Ala Ala Lys Ile Arg
50 55 60

10 His Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

15
<210> 177
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 177

Met Gly Ser Trp Gln Glu Phe Thr Thr Arg Leu Glu Ala Ile Tyr His
1 5 10 15

Arg Leu Arg Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Asn Phe Glu
20 25 30

Gly Phe Ile Ala Glu Phe Glu Gly Asn Leu Gln Met Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Val His Glu Ala Tyr Ala Ile Met
50 55 60

20 Glu Glu Leu His Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 178
<211> 73

ES 2 866 202 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 178

5

```

Met Gly Ser Trp Val Glu Phe Phe Asp Arg Leu Lys Ala Ile His Asp
 1           5           10           15

Arg Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala His Phe Glu
          20           25           30

Lys Leu Ile Ala His Phe Glu His Arg Leu Gln Asn Tyr Lys Gly Lys
          35           40           45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Glu Lys Glu Ala Asp Ala Ile Leu
 50           55           60

Tyr Glu Leu Ala Ala Tyr Arg His Asn
65           70

```

<210> 179
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 179

10

```

Met Gly Ser Trp Tyr Tyr Phe Lys His His Leu Ala Trp Ile Lys Met
 1           5           10           15

Glu Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala His Phe Glu
          20           25           30

Ser Ser Ile Ala Ser Phe Glu Arg Asp Leu Gln Gln Tyr Lys Gly Lys
          35           40           45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ala Leu Arg Lys Glu Ala Ala Ala Ile Arg
 50           55           60

Asp Glu Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65           70

```

15

<210> 180
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 180

20

```

Met Gly Ser Trp Val Glu Phe His Ile Arg Leu His Ala Ile Gln Tyr
 1           5           10           15

```

25

ES 2 866 202 T3

Arg Leu Tyr Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Glu Leu Arg His Trp Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Leu Gln Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 181
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 181

Met Gly Ser Trp Asn Glu Phe His Asp Arg Leu Asn Ala Ile His Ala
1 5 10 15

Arg Leu His Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asn Leu Arg Asp Asp Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

Arg Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 182
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 182

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Thr Val Arg Leu Glu Ala Ile His Glu
1 5 10 15

Arg Leu Lys Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Arg Asp Asp Ala Ala Phe Ile Arg
 50 55 60

Arg Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
 65 70

<210> 183
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 183

Met Gly Ser Trp Lys Glu Phe Asp Asp Arg Leu Asn Ala Ile Lys Ala
 1 5 10 15

Arg Leu Gln Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
 20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
 35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Asp Asp Ala Ala Phe Ile Arg
 50 55 60

Arg Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
 65 70

<210> 184
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 184

Met Gly Ser Trp Tyr Glu Phe Asp Asp Arg Leu Asn Ala Ile His Asp
 1 5 10 15

Arg Leu Gln Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
 20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
 35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asp Leu Arg Asp Asp Ala Ala Phe Ile Arg
 50 55 60

Arg Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
 65 70

<210> 185
 <211> 73

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 185

5

Met Gly Ser Trp Asn Glu Phe Lys Asn Arg Leu Asp Ala Ile His Lys
1 5 10 15

Arg Leu Asn Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Asn Leu Arg Asp Asp Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

His Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

<210> 186
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 186

10

Met Gly Ser Trp Thr Glu Phe Glu Gln Arg Leu Glu Ala Ile His Asn
1 5 10 15

Arg Leu Gln Ala Leu Gly Gly Ser Glu Ala Glu Leu Ala Ala Phe Glu
20 25 30

Lys Glu Ile Ala Ala Phe Glu Ser Glu Leu Gln Ala Tyr Lys Gly Lys
35 40 45

Gly Asn Pro Glu Val Glu Glu Leu Arg Asn Asp Ala Ala Phe Ile Arg
50 55 60

His Phe Leu Gln Ala Tyr Arg His Asn
65 70

15

<210> 187
<211> 378
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<220>
<221> misc_feature
<223> CD123 (receptor-alfa de interleucina-3)

25

<400> 187

ES 2 866 202 T3

Met	Val	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Ile	Ala	Leu	Pro	Cys	Leu	1	5	10	15
Leu	Gln	Thr	Lys	Glu	Asp	Pro	Asn	Pro	Pro	Ile	Thr	Asn	Leu	Arg	Met	20	25	30	
Lys	Ala	Lys	Ala	Gln	Gln	Leu	Thr	Trp	Asp	Leu	Asn	Arg	Asn	Val	Thr	35	40	45	
Asp	Ile	Glu	Cys	Val	Lys	Asp	Ala	Asp	Tyr	Ser	Met	Pro	Ala	Val	Asn	50	55	60	
Asn	Ser	Tyr	Cys	Gln	Phe	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	Cys	Glu	Val	Thr	Asn	65	70	75	80
Tyr	Thr	Val	Arg	Val	Ala	Asn	Pro	Pro	Phe	Ser	Thr	Trp	Ile	Leu	Phe	85	90	95	
Pro	Glu	Asn	Ser	Gly	Lys	Pro	Trp	Ala	Gly	Ala	Glu	Asn	Leu	Thr	Cys	100	105	110	
Trp	Ile	His	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Ser	Cys	Ser	Trp	Ala	Val	Gly	Pro	115	120	125	
Gly	Ala	Pro	Ala	Asp	Val	Gln	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Leu	Asn	Val	Ala	Asn	130	135	140	
Arg	Arg	Gln	Gln	Tyr	Glu	Cys	Leu	His	Tyr	Lys	Thr	Asp	Ala	Gln	Gly	145	150	155	160
Thr	Arg	Ile	Gly	Cys	Arg	Phe	Asp	Asp	Ile	Ser	Arg	Leu	Ser	Ser	Gly	165	170	175	
Ser	Gln	Ser	Ser	His	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Arg	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly	180	185	190	
Ile	Pro	Cys	Thr	Asp	Lys	Phe	Val	Val	Phe	Ser	Gln	Ile	Glu	Ile	Leu	195	200	205	
Thr	Pro	Pro	Asn	Met	Thr	Ala	Lys	Cys	Asn	Lys	Thr	His	Ser	Phe	Met	210	215	220	
His	Trp	Lys	Met	Arg	Ser	His	Phe	Asn	Arg	Lys	Phe	Arg	Tyr	Glu	Leu	225	230	235	240
Gln	Ile	Gln	Lys	Arg	Met	Gln	Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Gln	Val	Arg	Asp				

ES 2 866 202 T3

				245					250					255	
Arg	Thr	Ser	Phe	Gln	Leu	Leu	Asn	Pro	Gly	Thr	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile
			260					265					270		
Arg	Ala	Arg	Glu	Arg	Val	Tyr	Glu	Phe	Leu	Ser	Ala	Trp	Ser	Thr	Pro
		275					280					285			
Gln	Arg	Phe	Glu	Cys	Asp	Gln	Glu	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr	Arg	Ala	Trp
	290					295					300				
Arg	Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	Ala	Leu	Val	Cys
305					310					315					320
Val	Phe	Val	Ile	Cys	Arg	Arg	Tyr	Leu	Val	Met	Gln	Arg	Leu	Phe	Pro
				325					330					335	
Arg	Ile	Pro	His	Met	Lys	Asp	Pro	Ile	Gly	Asp	Ser	Phe	Gln	Asn	Asp
			340					345					350		
Lys	Leu	Val	Val	Trp	Glu	Ala	Gly	Lys	Ala	Gly	Leu	Glu	Glu	Cys	Leu
		355					360					365			
Val	Thr	Glu	Val	Gln	Val	Val	Gln	Lys	Thr						
	370					375									

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de unión a objetivo que comprende una secuencia de aminoácidos de

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQ
X₄₄YKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGN
PEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESSELQAYKGKGNP
EVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃A
YKGKGNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQ
X₄₄YKGKGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂Y
Z₂NPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:7),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVE
ALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:8),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAAFEKEIAAFESSELQAYZ₂NPEVE
X₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:9),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AY
Z₂NPEVEX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10)

o

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂Y
Z₂NPEVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11),

en donde

- (a) X_n es un aminoácido natural o no natural;
(b) Z₁ y Z₂ comprenden entre 2 y 30 aminoácidos naturales o no naturales;
(c) el polipéptido de unión a objetivo se une a un objetivo de interés, en donde la unión específica del polipéptido de unión a objetivo al objetivo de interés es mayor que la unión de un polipéptido de referencia que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 al objetivo de interés; y

(d) el polipéptido de unión a objetivo no comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:50.

2. El polipéptido de unión a objetivo de la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

3. El polipéptido de unión a objetivo de la reivindicación 1 o 2, en donde Xn no es una cisteína o una prolina.

4. El polipéptido de unión a objetivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el objetivo de interés es un antígeno de cáncer, opcionalmente en donde el antígeno de cáncer es PD-L1, CD137 o CD123, y opcionalmente en donde

(a) el objetivo de interés es PD-L1 y el polipéptido de unión al objetivo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43 y SEQ ID NO:44;

(b) el objetivo de interés es CD137 y el polipéptido de unión al objetivo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 y SEQ ID NO:19;

(c) el objetivo de interés es CD123 y el polipéptido de unión al objetivo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOS: 92-126 y SEQ ID NO:127; O

(d) el objetivo de interés es CD123 y el polipéptido de unión al objetivo se completa con el polipéptido de unión al objetivo de (c) para la unión a CD123.

5. El polipéptido de unión a objetivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el polipéptido de unión al objetivo está etiquetado y opcionalmente, en donde la etiqueta es una etiqueta de biotina o se selecciona del grupo que consiste de una etiqueta enzimática, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente y una etiqueta bioluminiscente.

6. El polipéptido de unión a objetivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido de unión al objetivo está conjugado con un agente terapéutico o citotóxico.

7. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de unión a objetivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Un equipo que comprende el polipéptido de unión a objetivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

9. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de unión a objetivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

10. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 9, y opcionalmente que comprende además una secuencia de nucleótidos que regula la expresión del polipéptido de unión a objetivo codificado por la molécula de ácido nucleico.

11. Una célula hospedante que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9 o el vector de la reivindicación 10.

12. Una línea celular que comprende el polipéptido de unión a objetivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

13. Un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende

(a) un dominio de direccionamiento,

(b) un dominio transmembrana y

(c) un dominio de señalización intracelular,

en donde el dominio de direccionamiento comprende el polipéptido de unión a objetivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

14. El CAR de la reivindicación 13, que se caracteriza por uno o más de

(a) el dominio de señalización intracelular se selecciona del grupo que consiste de un dominio zeta de CD3 de humano, dominio 41BB, un dominio de CD28 y cualquier combinación de los mismos,

(b) el polipéptido de unión a objetivo se une a un antígeno tumoral asociado a un tumor maligno hematológico o un tumor sólido,

(c) el polipéptido de unión a objetivo se une a un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste de CD137, PD-L1, CD123, CTLA4, CD47, KIR, DR5, TIM3, PD1, EGFR, TCR, CD19, CD20, CD22, ROR 1, mesotelina,

CD33/1L3Ra, cMet, PSMA, Glicolípido F77, EGFRVIII, GD2, NY-ESO-1, MAGE A3, y combinaciones de los mismos,

(d) el dominio de señalización intracelular comprende una región de señalización coestimuladora y

(e) el dominio de señalización intracelular comprende una región de señalización coestimuladora que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste de CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, antígeno asociado con la función de linfocitos-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83, y cualquier combinación de los mismos.

15. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia que codifica el CAR de la reivindicación 13 o la reivindicación 14.

16. Una célula que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el CAR de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, opcionalmente en donde la célula es una célula T o una célula asesina natural (NK) y opcionalmente en donde la célula exhibe una inmunidad antitumoral cuando el polipéptido de unión a objetivo se une a su antígeno tumoral correspondiente.

17. Una célula inmune que comprende el CAR de la reivindicación 13 o la reivindicación 14 para su uso en el tratamiento de cáncer, opcionalmente en donde la célula inmune es una célula T o una célula asesina natural (NK).

18. Un polipéptido de dominio de unión de novo (DBDpp) que comprende tres hélices alfa anti-paralelas unidas por péptidos conectores, en donde

(a) el DBDpp es un péptido sintético derivado de modificaciones a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, en donde las modificaciones consisten de 1 a 30 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras seleccionadas de las posiciones 1-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20-27, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43-52, 54, 55, 57-59, 61, 62, 64-66 y 68-73 de la SEQ ID NO:1;

(b) el DBDpp se une específicamente a un objetivo de interés, en donde la unión específica del DBDpp al objetivo de interés es mayor que la unión de un polipéptido de referencia que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 a la diana de interés; y

(c) el DBDpp no comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:50.

19. El polipéptido de dominio de unión de novo (DBDpp) de la reivindicación 18, en donde las modificaciones consisten de 1 a 30 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras seleccionadas de las posiciones 2-6, 8-10, 12, 13, 15-17, 19, 20, 29, 30, 32-34, 36, 37, 39-41, 43, 44, 52, 54, 55, 57-59, 61, 62, 64-66, 68, 69 y 70 de la SEQ ID NO:1.

20. El DBDpp de la reivindicación 18 o la reivindicación 19 que comprende una secuencia de aminoácidos de

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQ
X₄₄YKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGN
PEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESLQAYKGKGNP
EVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃A
YKGKGNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQ
X₄₄YKGKGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6),

en donde X_n es un aminoácido natural o no natural.

21. El DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 que se une específicamente a una proteína que comprende los aminoácidos 19-305 de CD123 (SEQ ID NO: 187) o una proteína que es por lo menos 95% idéntica a CD123, opcionalmente en donde el DBDpp se caracteriza por uno o más de

- (a) el DBDpp se une a la proteína que comprende los aminoácidos 19-305 de CD123 (SEQ ID NO: 187) o la proteína que es por lo menos 95% idéntica a CD123 con una constante de disociación (KD) entre 10^{-4} M y 10^{-12} M,
- (b) el DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos de MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKGKGNPEV EX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4), en donde X_n es un aminoácido natural o no natural,
- (c) el DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos de MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAEAAFEKEIAAFESELQAYKGKGNPEV EX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4), en donde X_n es un aminoácido natural o no natural y en donde X_n no es cisteína o prolina y
- (d) el DBDpp comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:60 - SEQ ID NO:136 y
- (e) el DBDpp es capaz de unirse a un tumor.

22. Una proteína de fusión que comprende un primer y un segundo DBDpp de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18-21 en donde el primer y el segundo DBDpp exhibe especificidad de unión por un objetivo tumoral, opcionalmente en donde el primer y el segundo DBDpp exhibe especificidad de unión por diferentes objetivos tumorales.

23. El DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18-21 o la proteína de fusión de la reivindicación 22, en donde el DBDpp o la proteína de fusión está etiquetado y opcionalmente, en donde la etiqueta es una etiqueta de biotina o se selecciona del grupo que consiste de una etiqueta enzimática, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente y una etiqueta bioluminiscente.

24. El DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 y 23 o la proteína de fusión de la reivindicación 22 o la reivindicación 23, en donde el polipéptido de unión a objetivo, DBDpp, o la proteína de fusión está conjugado a un agente terapéutico o citotóxico.

25. Una composición farmacéutica que comprende el DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, 23 y 24 o la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 y que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

26. Un equipo que comprende el DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, 23 y 24 o la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24.

27. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18-21 o la proteína de fusión de la reivindicación 22.

28. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 27 y opcionalmente que comprende además una secuencia de nucleótidos que regula la expresión del DBDpp o la proteína de fusión codificados por la molécula de ácido nucleico.

29. Una célula hospedante que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 27 o el vector de la reivindicación 28.

30. Una línea celular que comprende el DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18-21 o la proteína de fusión de la reivindicación 22.

31. Un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende

- (a) un dominio de direccionamiento,
- (b) un dominio transmembrana y
- (c) un dominio de señalización intracelular,

en donde el dominio de direccionamiento comprende el DBDpp de una cualquiera de las reivindicaciones 18-21 o la proteína de fusión de la reivindicación 22.

32. El CAR de la reivindicación 31, que se caracteriza por uno o más de

- (a) el dominio de señalización intracelular se selecciona del grupo que consiste de un dominio zeta de CD3 de humano, dominio 41BB, un dominio de CD28 y cualquier combinación de los mismos,
- (b) el polipéptido de unión a objetivo se une a un antígeno tumoral asociado a un tumor maligno hematológico o

un tumor sólido,

(c) el polipéptido de unión a objetivo se une a un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste de CD137, PD-L1, CD123, CTLA4, CD47, KIR, DR5, TIM3, PD1, EGFR, TCR, CD19, CD20, CD22, ROR 1, mesotelina, CD33/1L3Ra, cMet, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD2, NY-ESO-1, MAGE A3, y combinaciones de los mismos,

(d) el dominio de señalización intracelular comprende una región de señalización coestimuladora y

(e) el dominio de señalización intracelular comprende una región de señalización coestimuladora que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste de CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, antígeno asociado con la función de linfocitos-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83, y cualquier combinación de los mismos.

33. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia que codifica el CAR de la reivindicación 31 o la reivindicación 32.

34. Una célula que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el CAR de la reivindicación 31 o la reivindicación 32, opcionalmente en donde la célula es una célula T o una célula asesina natural (NK) y opcionalmente en donde la célula exhibe una inmunidad antitumoral cuando el polipéptido de unión a objetivo se une a su antígeno tumoral correspondiente.

35. Una célula inmune que comprende el CAR de la reivindicación 31 o la reivindicación 32 para su uso en el tratamiento de cáncer, opcionalmente en donde la célula inmune es una célula T o una célula asesina natural (NK).

36. Una célula T que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) para su uso en el tratamiento de cáncer, en donde el CAR comprende:

(a) un dominio de unión a objetivo que comprende un polipéptido de unión a objetivo que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁L
QX₄₄YKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKKGK
GNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESELQAYKKGK
GNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀EL
X₄₃AYKKGKGNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5),

y

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁L
QX₄₄YKGKGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6),

en donde Xn es un aminoácido natural o no natural, en donde Xn no es un residuo de cisteína o uno de prolina, en donde el polipéptido de unión a objetivo se une específicamente a un objetivo de interés expresado por una célula cancerosa y en donde la unión específica del polipéptido de unión a objetivo al objetivo de interés es mayor que la unión de un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO:1 al objetivo de interés,

(b) un dominio transmembrana seleccionado de 41BB y CD28 y

(c) un dominio intracelular, en donde el dominio intracelular comprende un dominio de señalización seleccionado de una cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T.

37. La célula inmune de acuerdo con la reivindicación 36, en donde la célula inmune es una célula T o una célula asesina natural (NK).

38. Un método para transformar un polipéptido de referencia en un polipéptido de unión a objetivo capaz de unirse específicamente a un objetivo de interés, comprendiendo el método:

- 5 (a) modificar una pluralidad de residuos de aminoácidos del polipéptido de referencia para generar una pluralidad de polipéptidos de unión a objetivo candidatos; en donde los polipéptidos de unión a objetivo candidatos comprenden una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, en donde los polipéptidos de unión a objetivo candidatos comprenden tres hélices alfa anti-paralelas unidas por péptidos conectores, en donde los
- 10 residuos de aminoácidos modificados son accesibles para solventes o inaccesibles para solventes y en donde la modificación comprende una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras y no incluye una sustitución con una cisteína o una prolina;
- (b) empacar la pluralidad de polipéptidos de unión a objetivo candidatos en una pluralidad de vectores para generar una colección de candidatos; y
- 15 (c) examinar la colección de candidatos por polipéptidos de unión a objetivo candidatos que exhiben una unión específica al objetivo de interés;

en donde los polipéptidos de unión a objetivo candidatos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQ
X₄₄YKGKGNPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:2),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃AYKGKGN
PEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:3),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAAFEKEIAAFESELQAYKGKGNP
EVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:4),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALGGSEAELAAFX₃₂X₃₃EIX₃₆AFX₃₉X₄₀ELX₄₃A
YKGKGNPEVEX₅₅LRX₅₈X₅₉AAX₆₂IRX₆₅X₆₆LQAYRHN (SEQ ID NO:5),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALGGSEAELAX₃₀FEX₃₃X₃₄IAX₃₇FEX₄₀X₄₁LQ
X₄₄YKGKGNPEVEALX₅₇X₅₈EAX₆₁AIX₆₄X₆₅ELX₆₈AYRHN (SEQ ID NO:6),

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂Y
Z₂NPEVEALRKEAAAIRDELQAYRHN (SEQ ID NO:7),

MGSWAEFKQRLAAIKTRLEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AYZ₂NPEVE
ALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:8),

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAAFEKEIAAFESELQAYZ₂NPEVE
X₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:9),

20

MGSWX₅X₆FKX₉X₁₀LAX₁₃IKX₁₆X₁₇LEALZ₁EAELAAFX₃₀X₃₁EIX₃₄AFX₃₇X₃₈ELX₄₁AY
Z₂NPEVEX₅₀LRX₅₃X₅₄AAX₅₇IRX₆₀X₆₁LQAYRHN (SEQ ID NO:10) y

MGSWX₅EFX₈X₉RLX₁₂AIX₁₅X₁₆RLX₁₉ALZ₁EAELAX₂₈FEX₃₁X₃₂IAX₃₅FEX₃₈X₃₉LQX₄₂Y
Z₂NPEVEALX₅₂X₅₃EAX₅₆AIX₅₉X₆₀ELX₆₃AYRHN (SEQ ID NO:11), en donde X_n es un aminoácido natural o no natural
y Z₁ y Z₂ comprenden entre 2 y 30 aminoácidos naturales o no naturales.

39. El método de la reivindicación 38, en donde el método comprende además identificar residuos de aminoácidos
potencialmente inmunógenos en un polipéptido de unión a objetivo candidato y modificar por lo menos uno de los
residuos de aminoácidos potencialmente inmunógenos en el polipéptido de unión a objetivo candidato, en donde la
modificación para reducir la inmunogenicidad comprende una sustitución de aminoácido.

40. Partículas similares a virus (VLP) que comprenden un polipéptido de fusión que comprende el DBDpp de una
cualquiera de las reivindicaciones 18-21, en donde las VLP son adecuadas para su uso como inmunógenos para la
generación de anticuerpos, en donde dichos anticuerpos se dirigen contra el DBDpp.

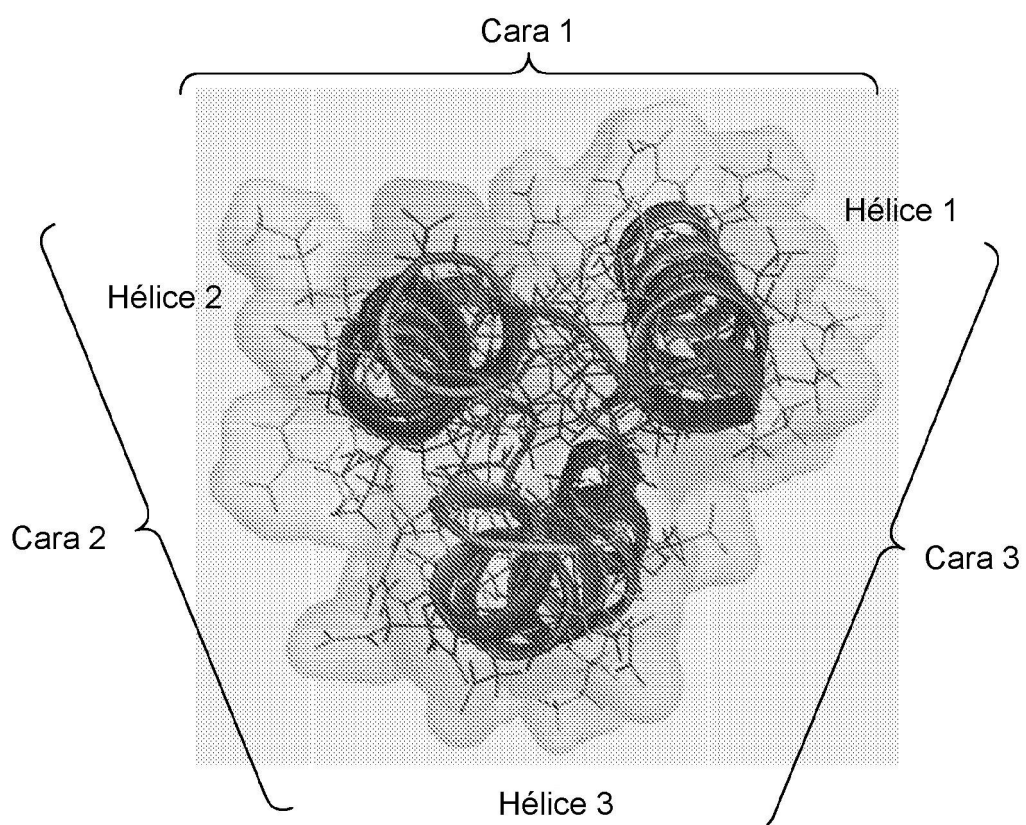


FIG. 1A

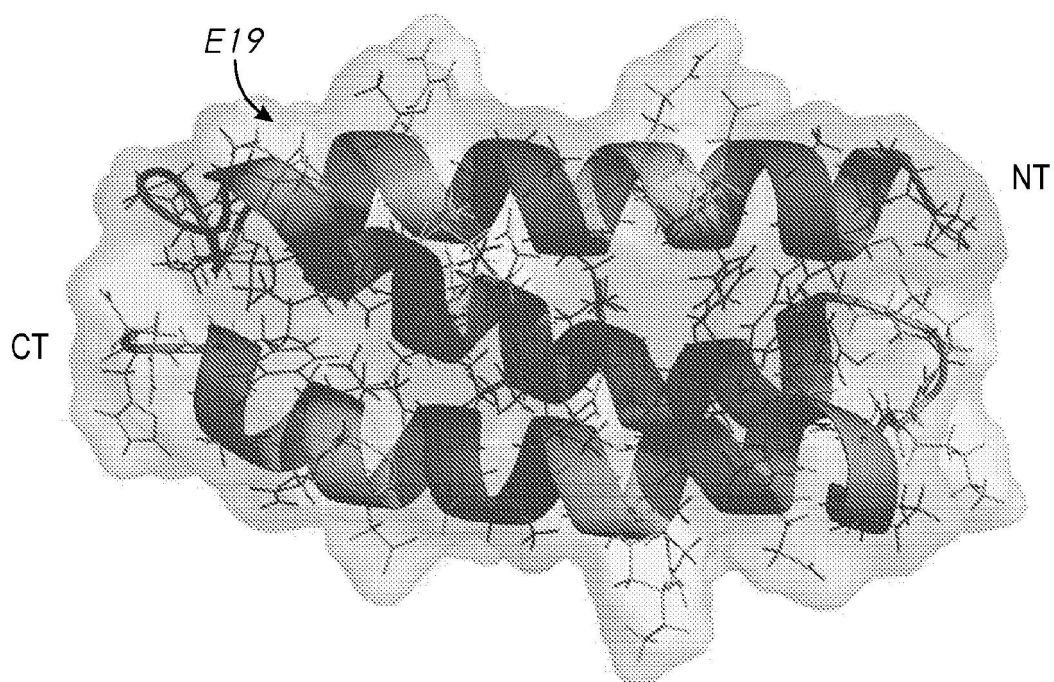


FIG. 1B

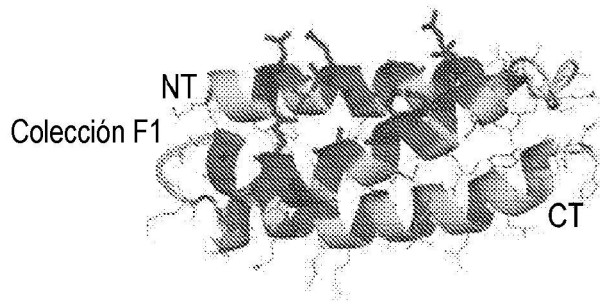


FIG. 2A

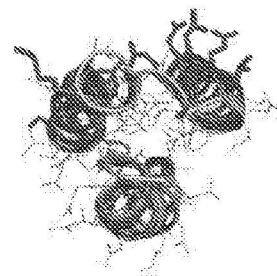


FIG. 2B

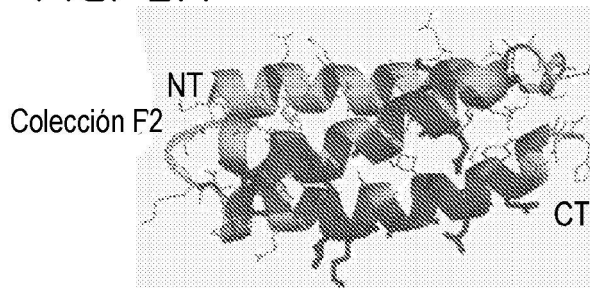


FIG. 2C

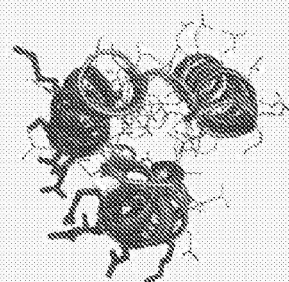


FIG. 2D

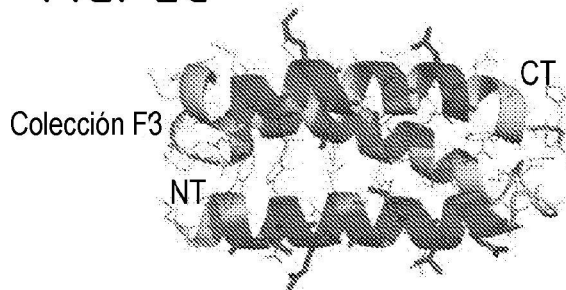


FIG. 2E

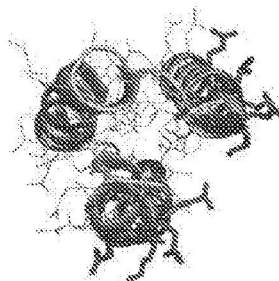


FIG. 2F

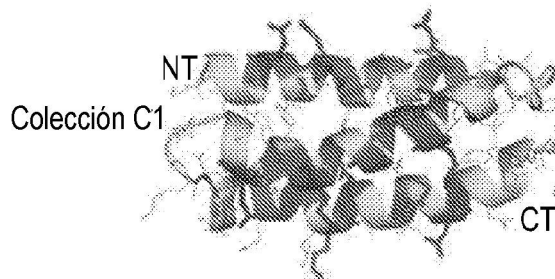


FIG. 2G

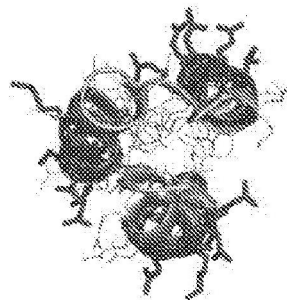


FIG. 2H

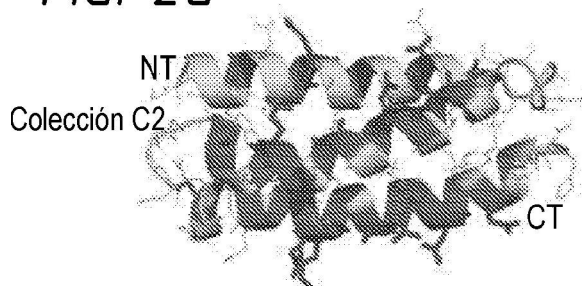


FIG. 2I

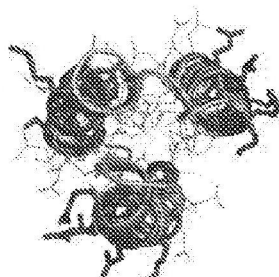


FIG. 2J

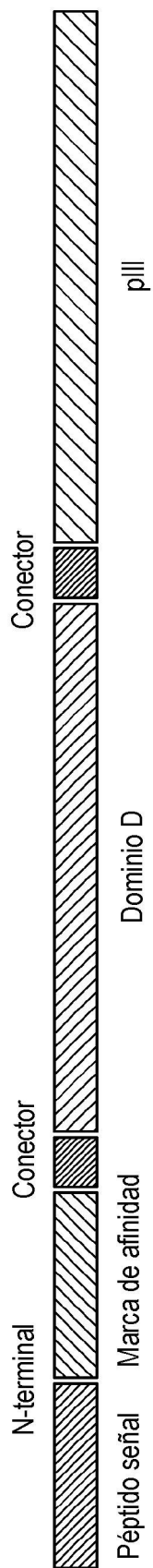


FIG. 3A

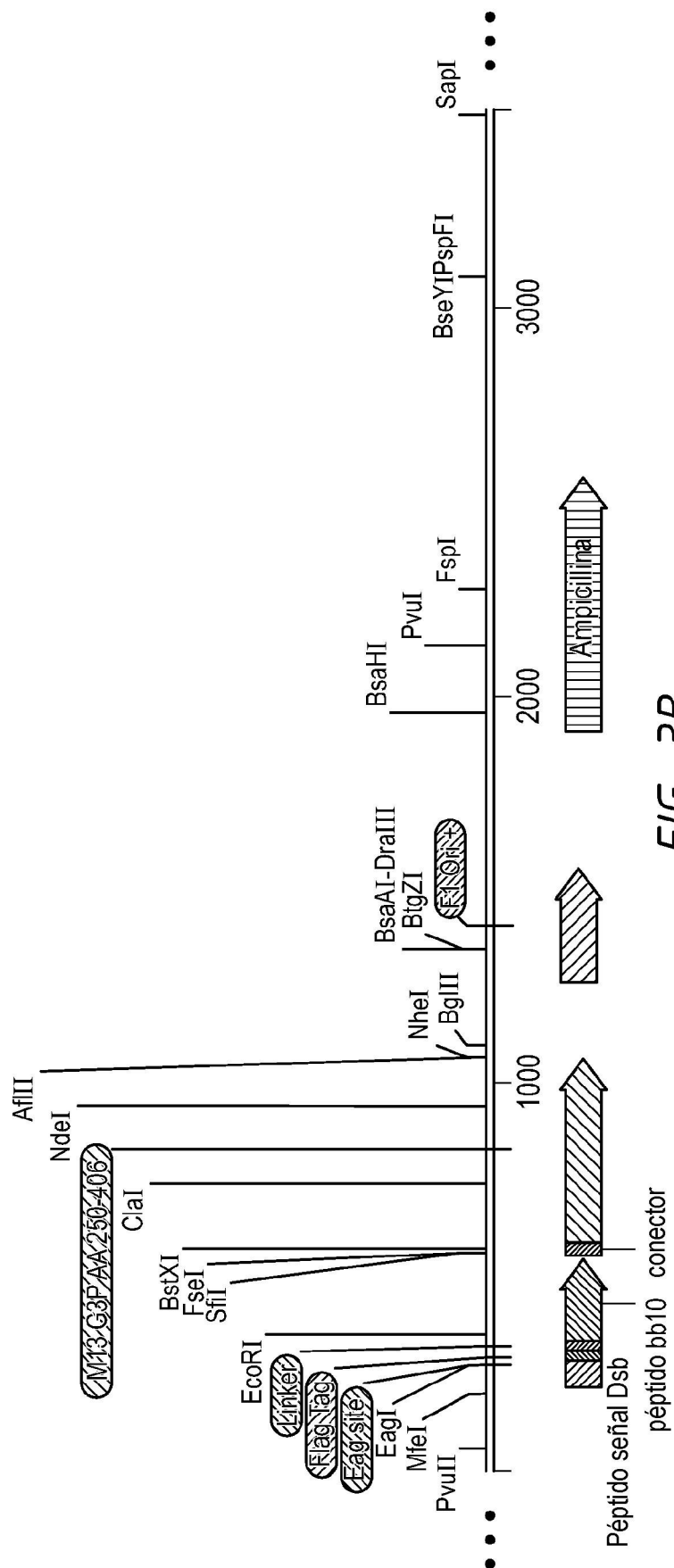


FIG. 3B

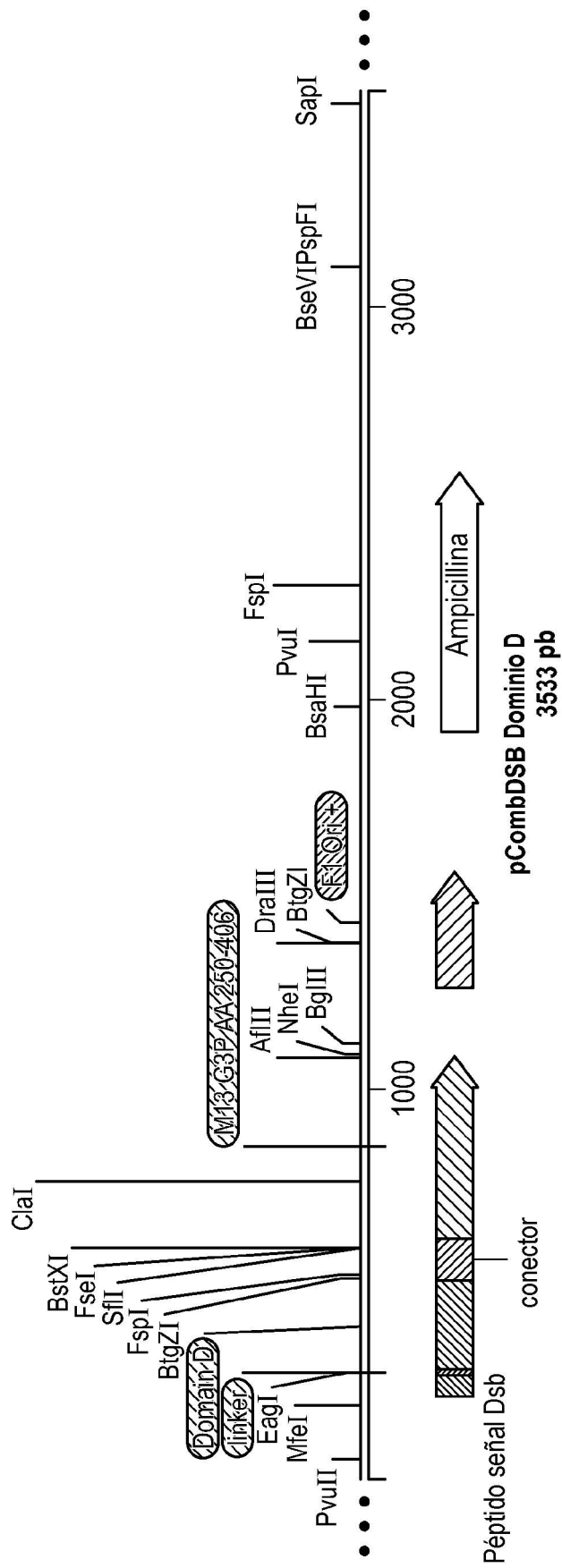


FIG. 3C

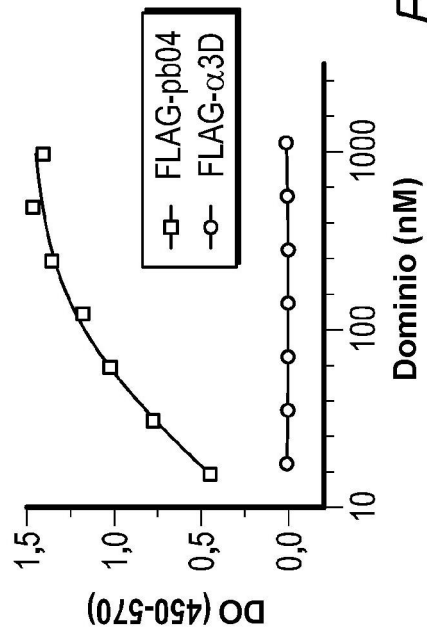


FIG. 3D

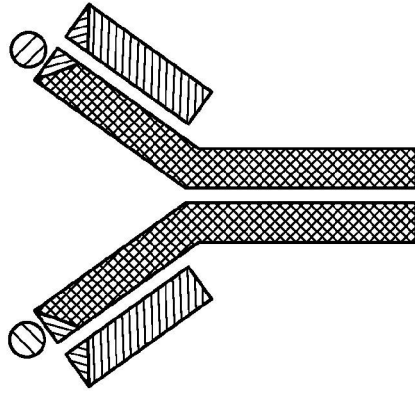


FIG. 4B

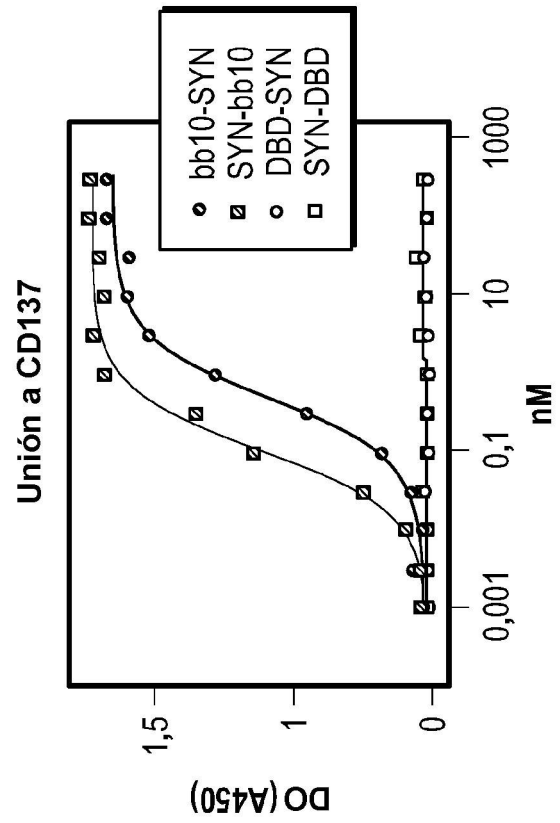


FIG. 4D

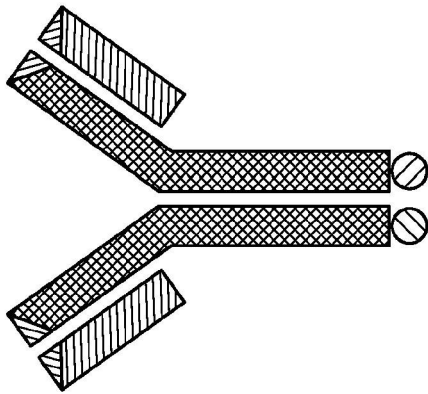


FIG. 4A

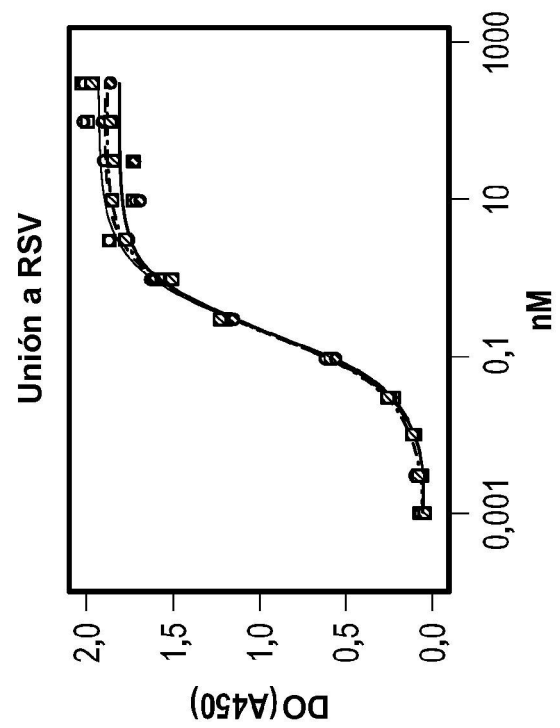


FIG. 4C

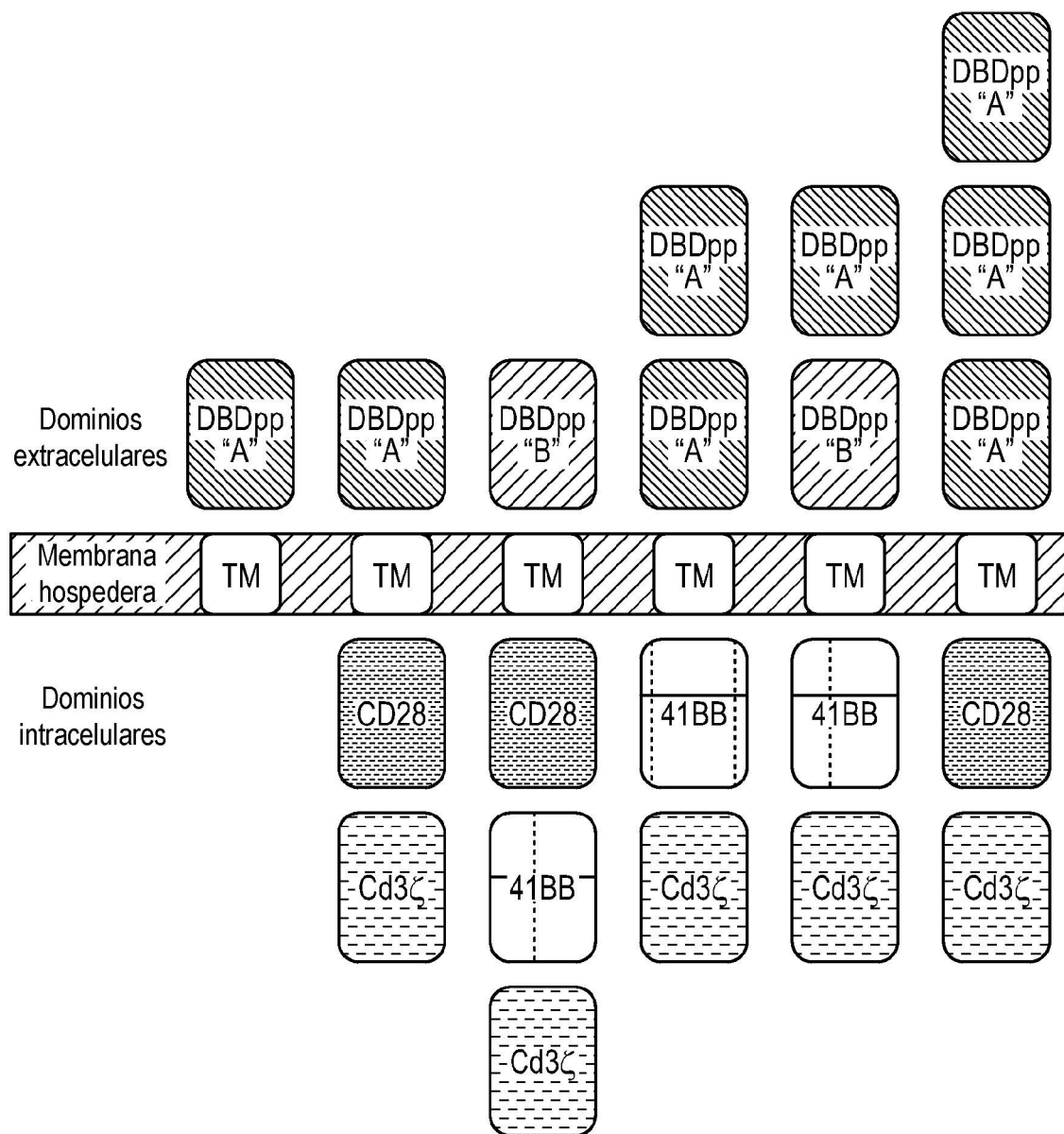


FIG. 5A

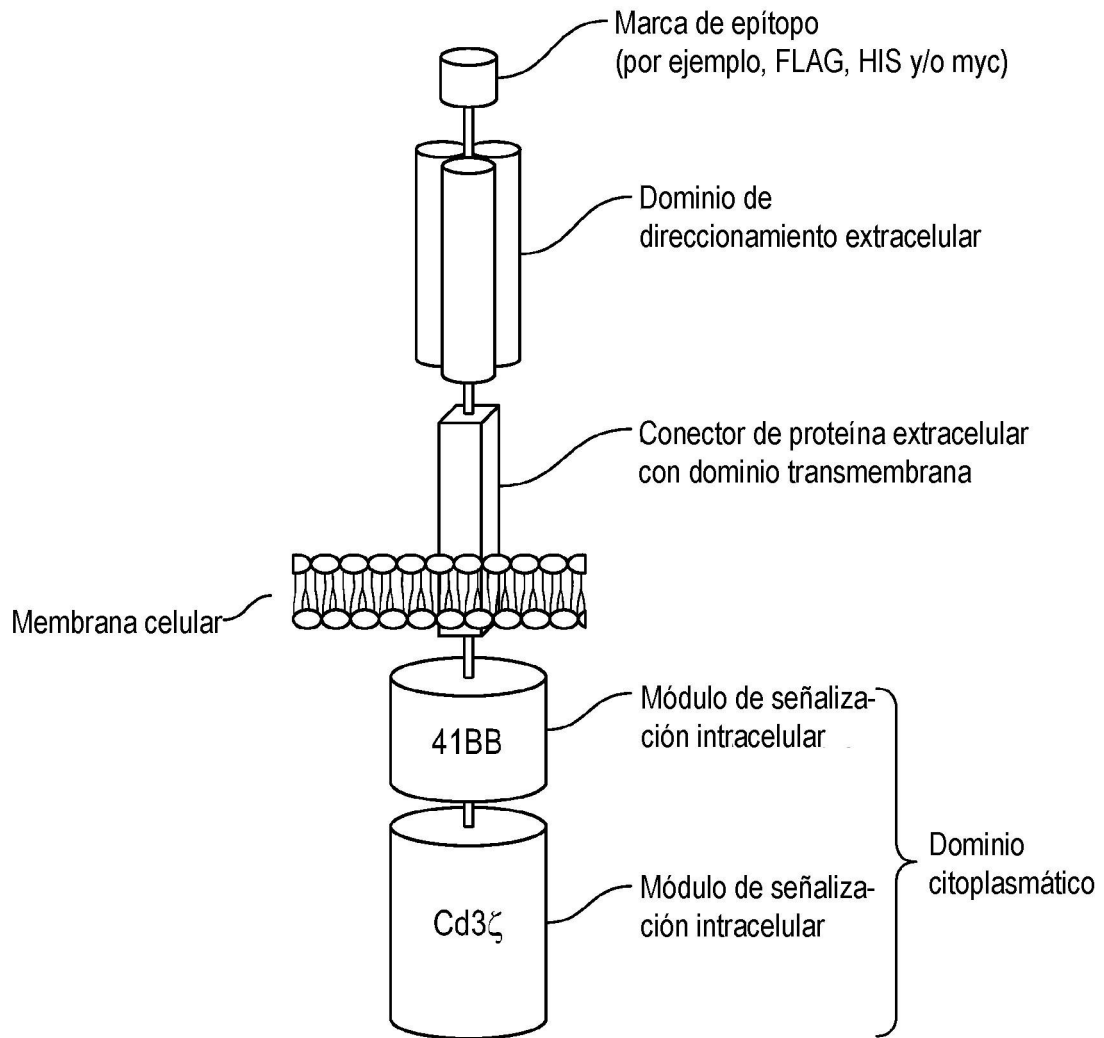


FIG. 5B

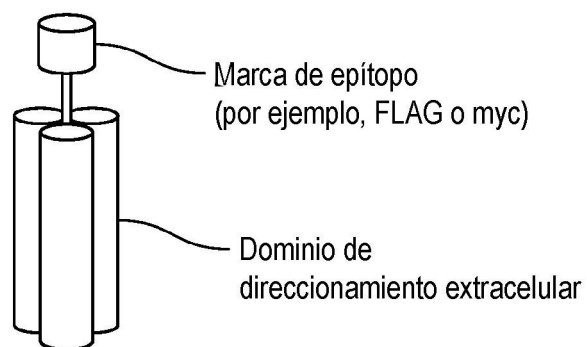


FIG. 5C

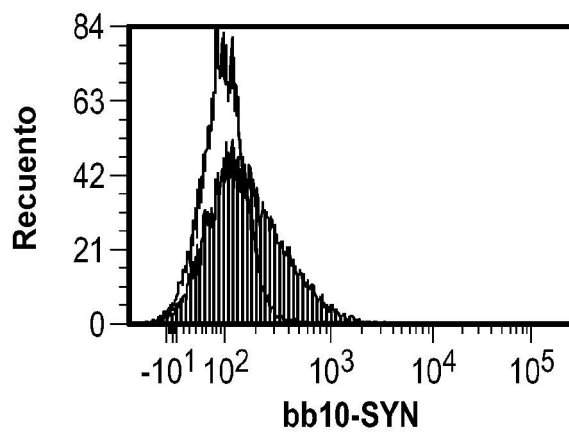


FIG. 6A

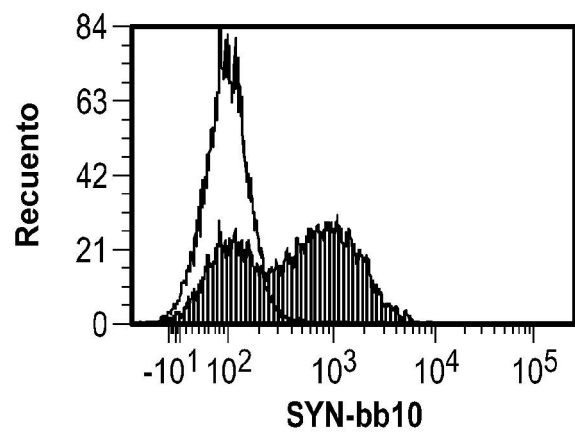


FIG. 6B

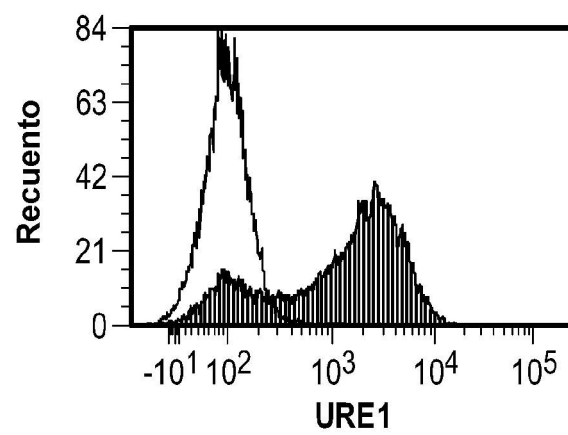


FIG. 6C

TNF α - Donador 1

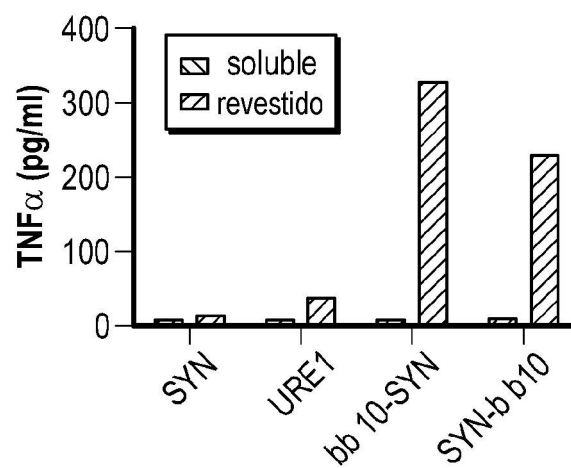


FIG. 7A

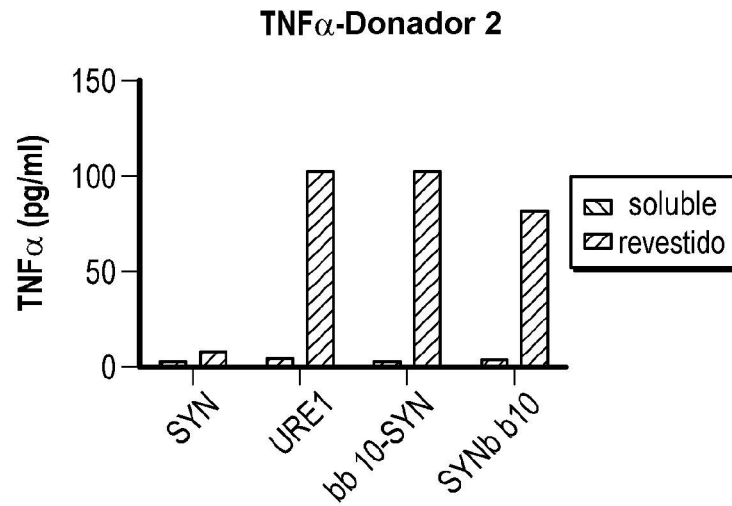


FIG. 7B

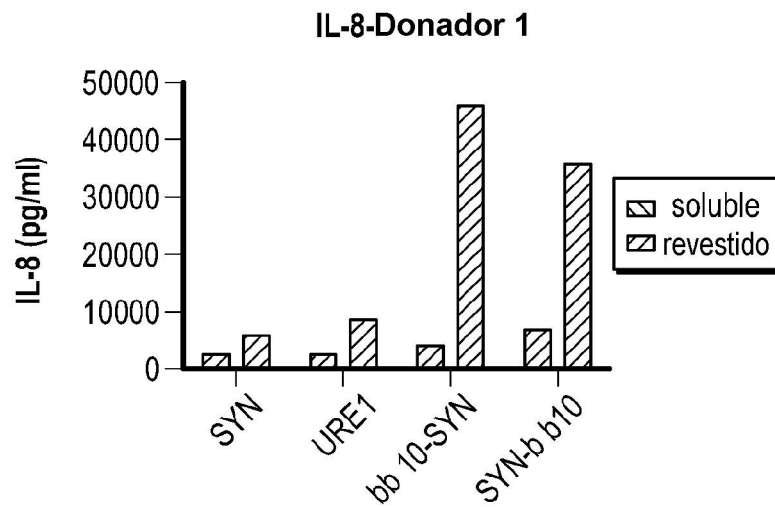


FIG. 7C

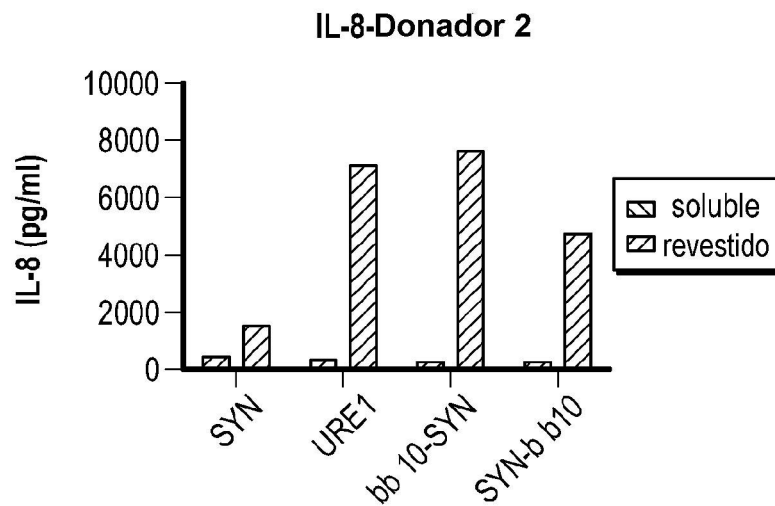


FIG. 7D

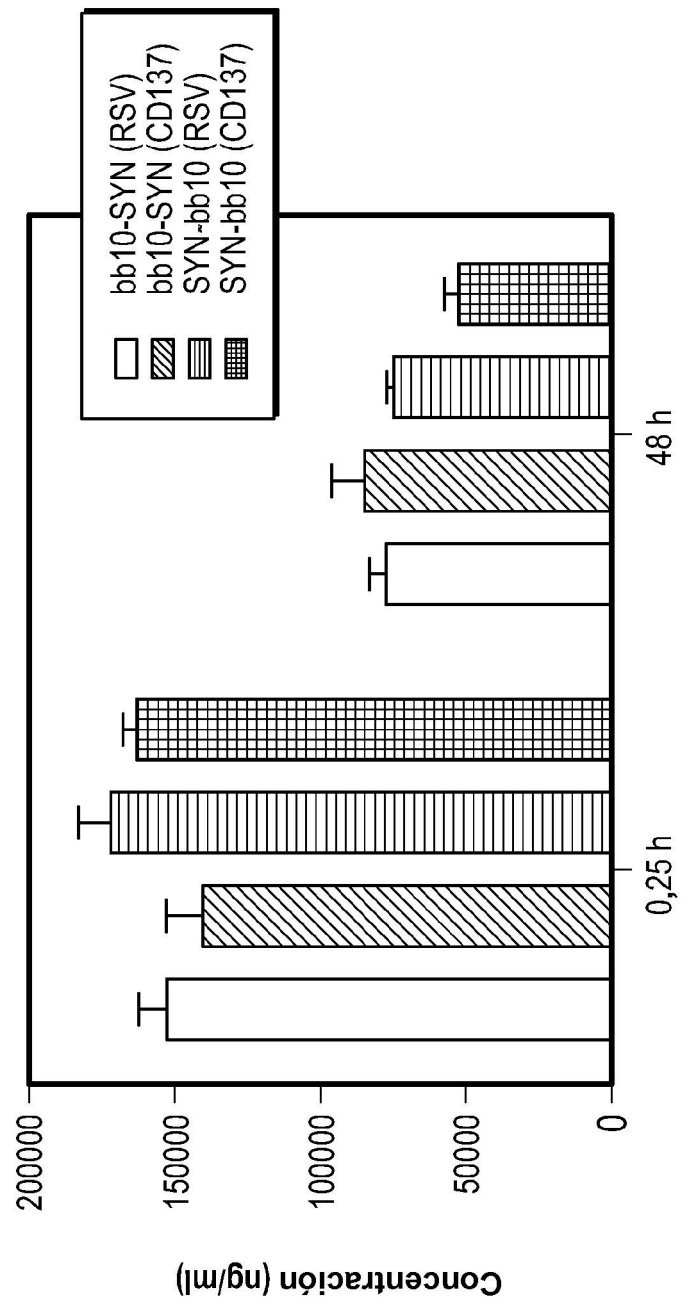


FIG. 8

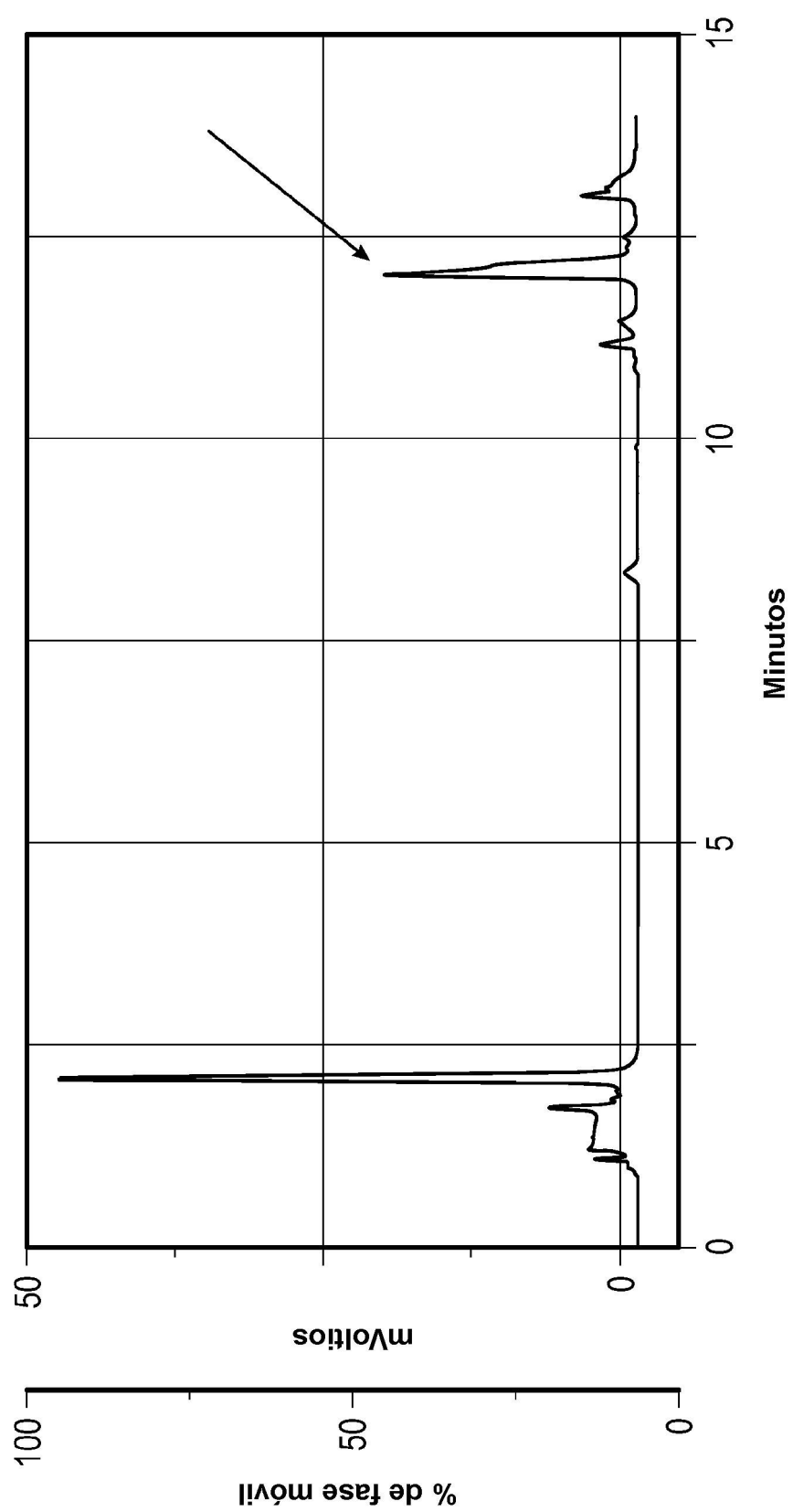


FIG. 9

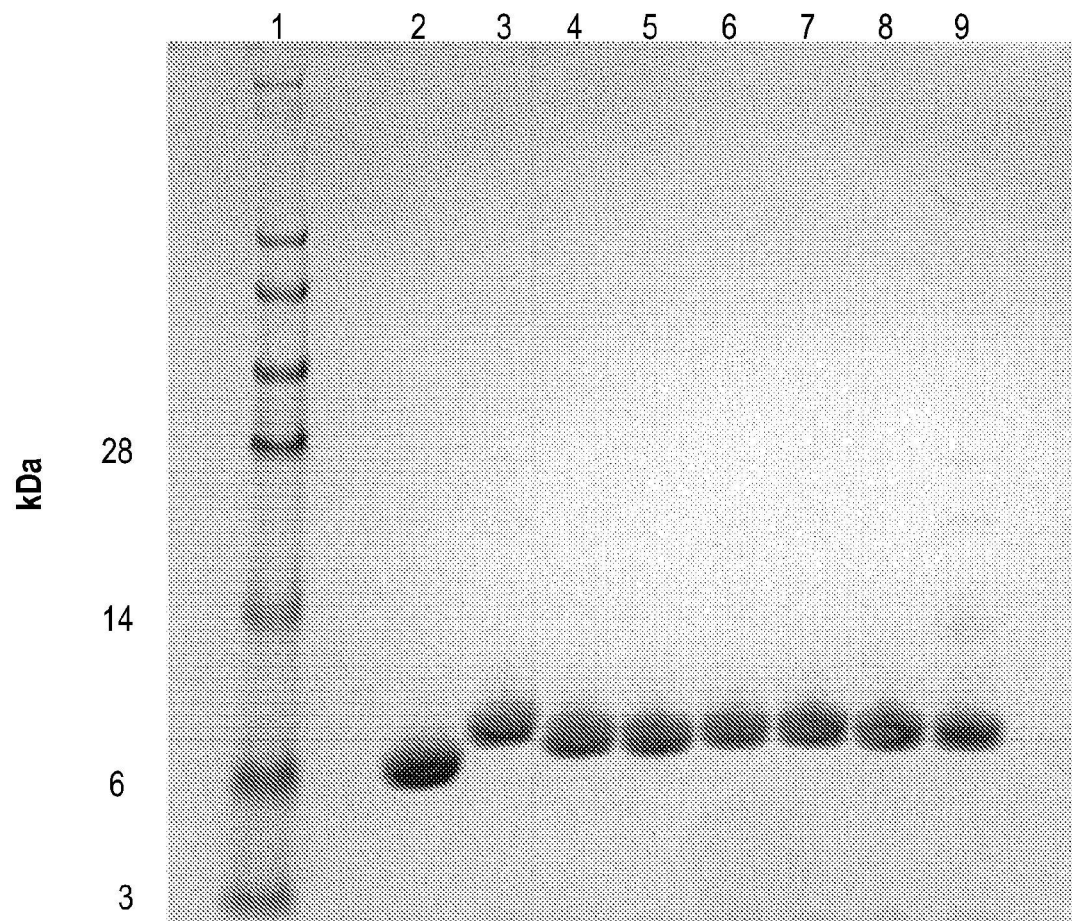


FIG. 10

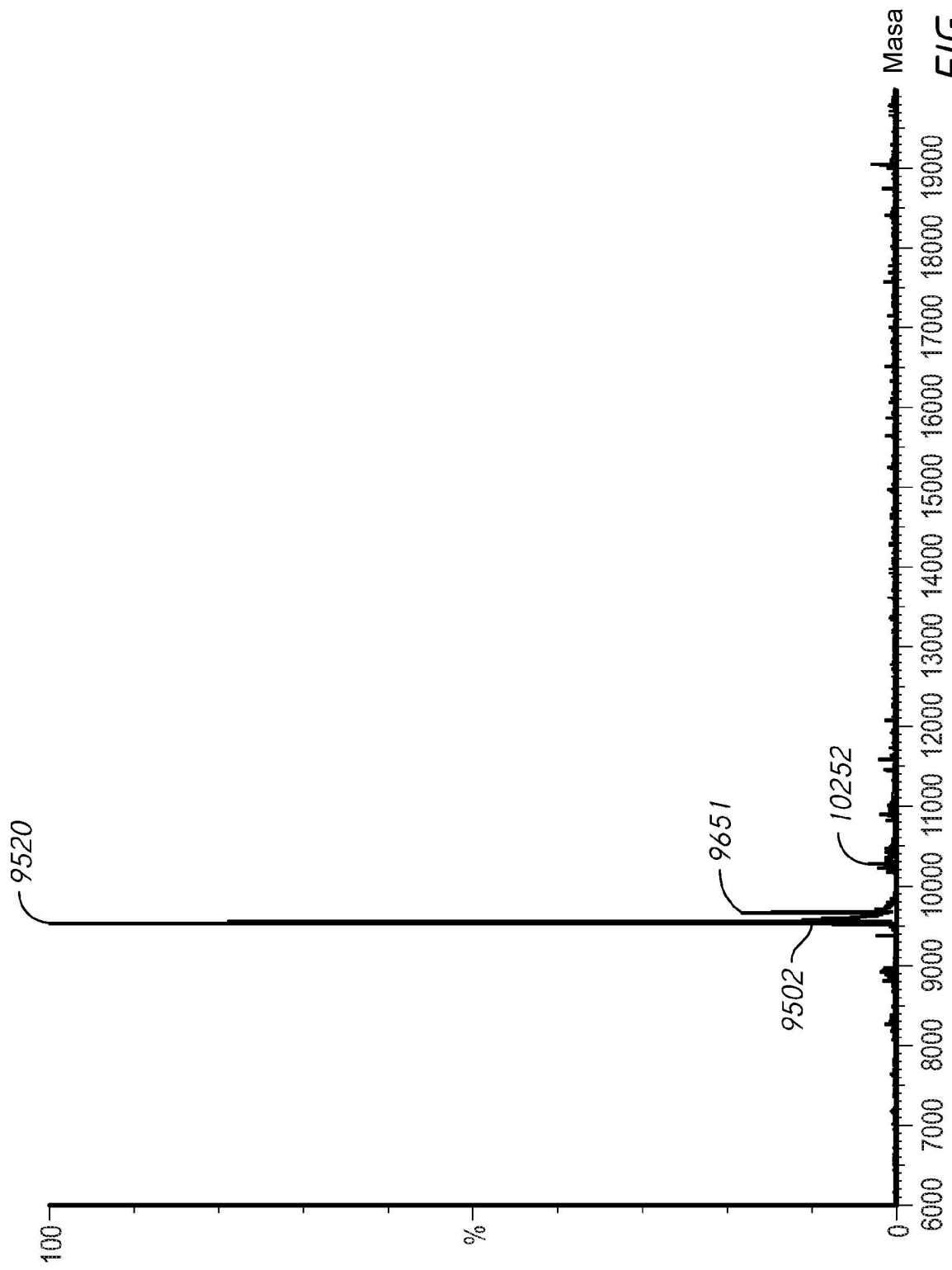


FIG. 11

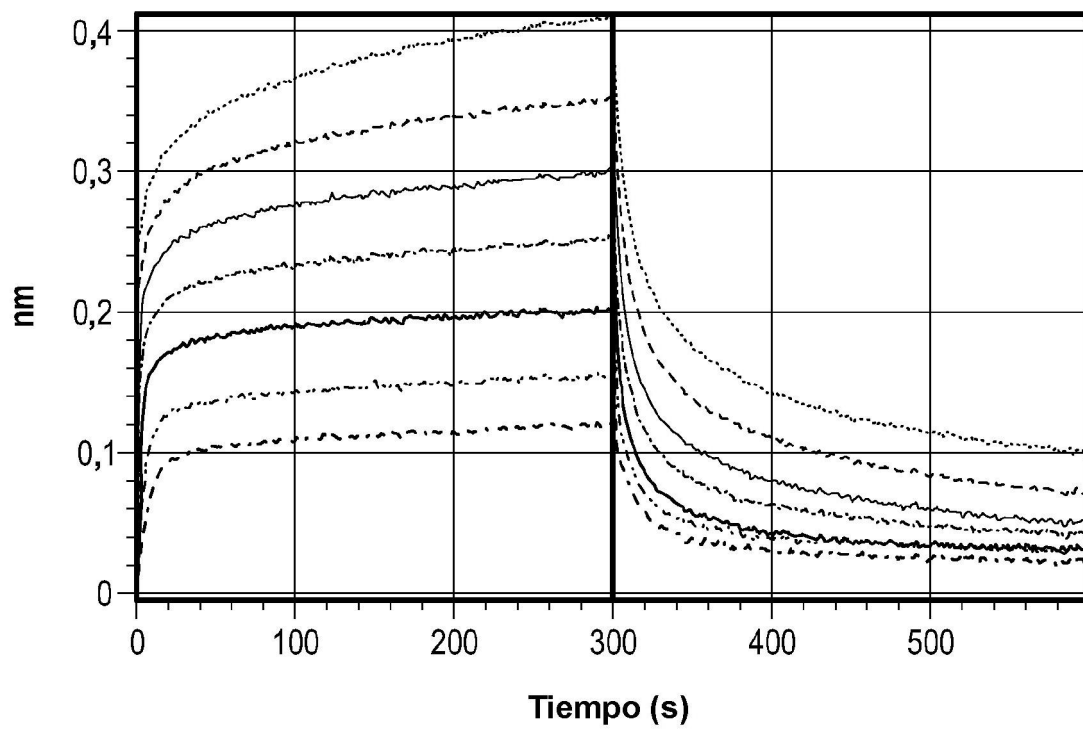


FIG. 12A

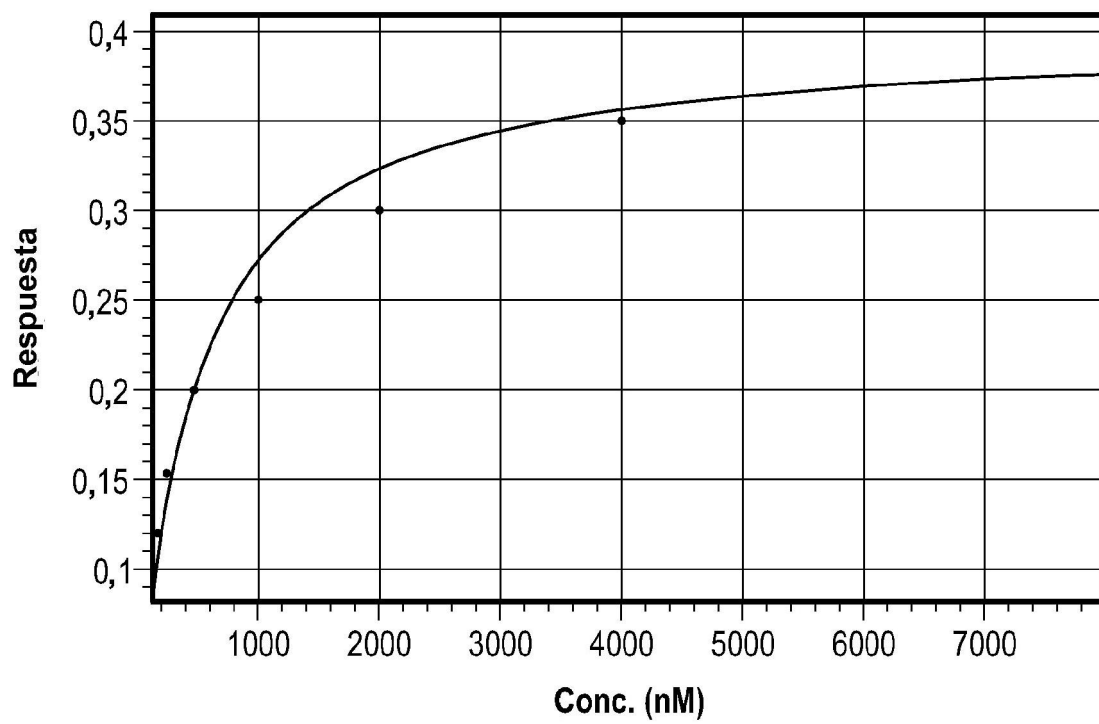


FIG. 12B

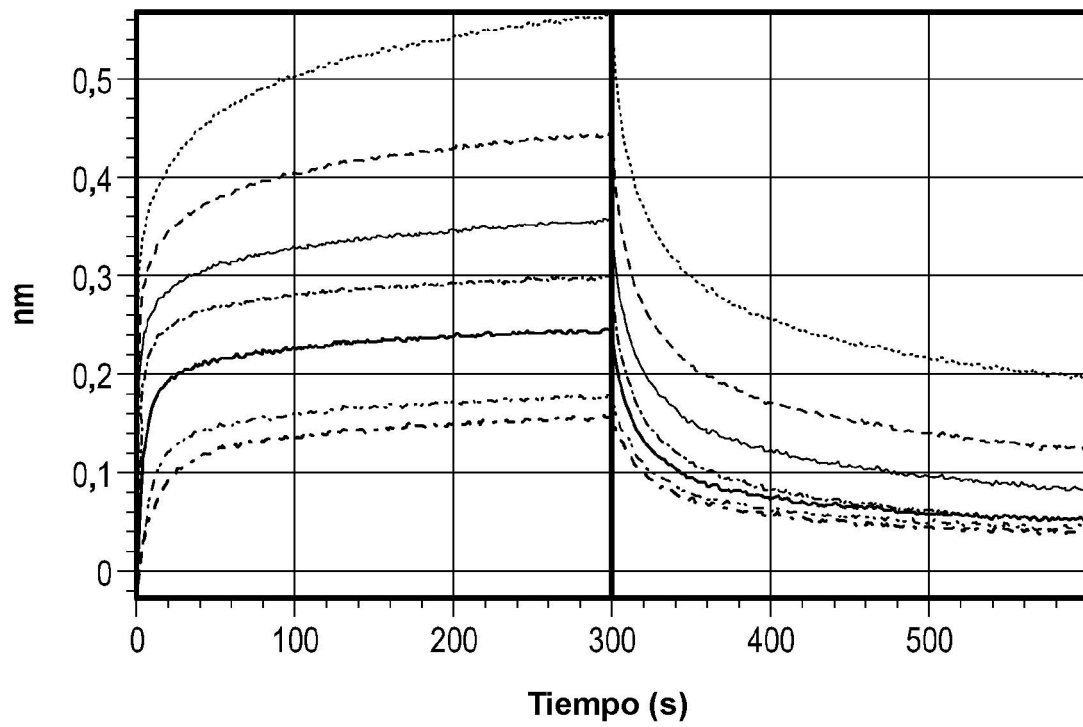


FIG. 12C

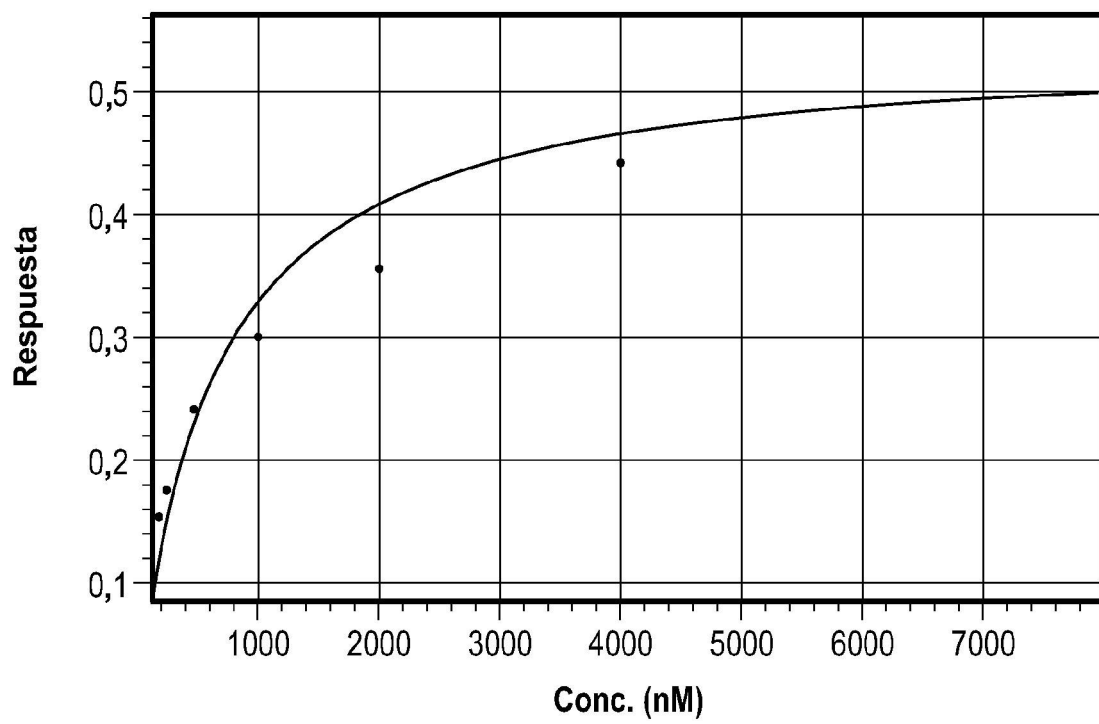


FIG. 12D

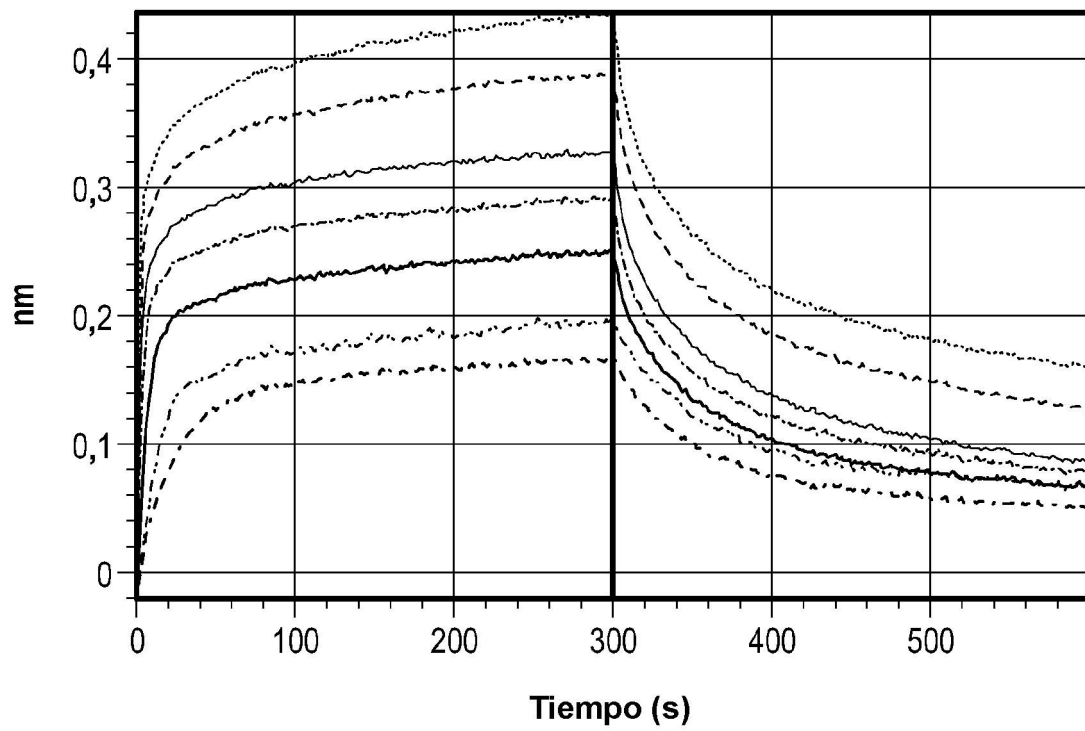


FIG. 12E

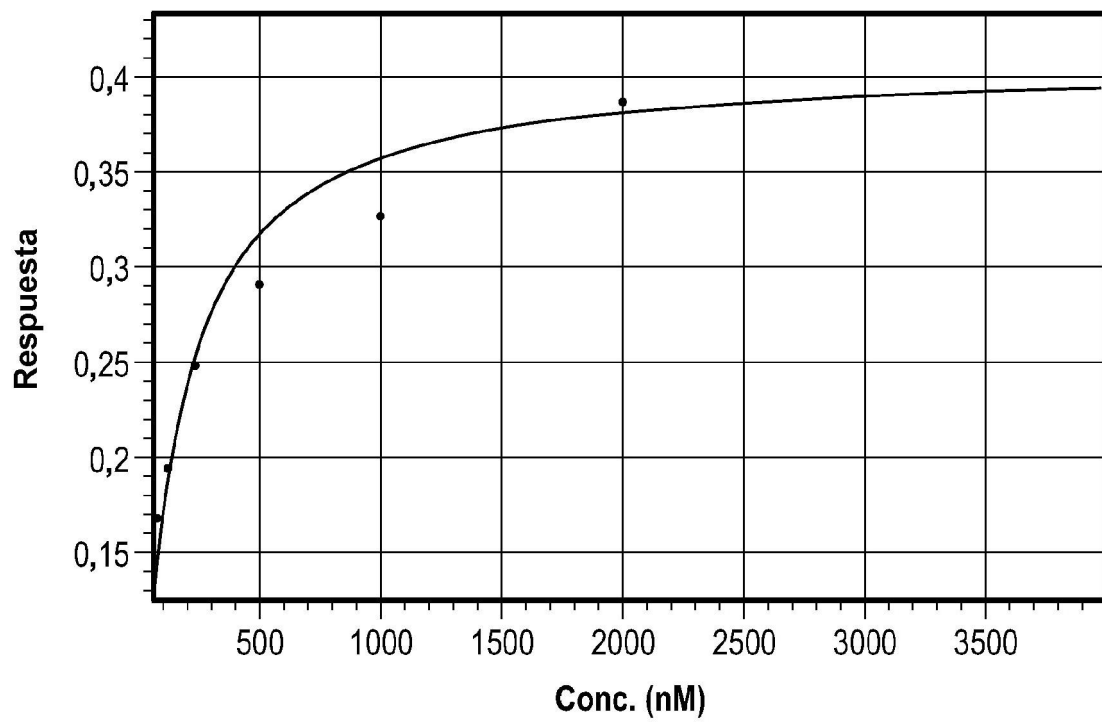


FIG. 12F

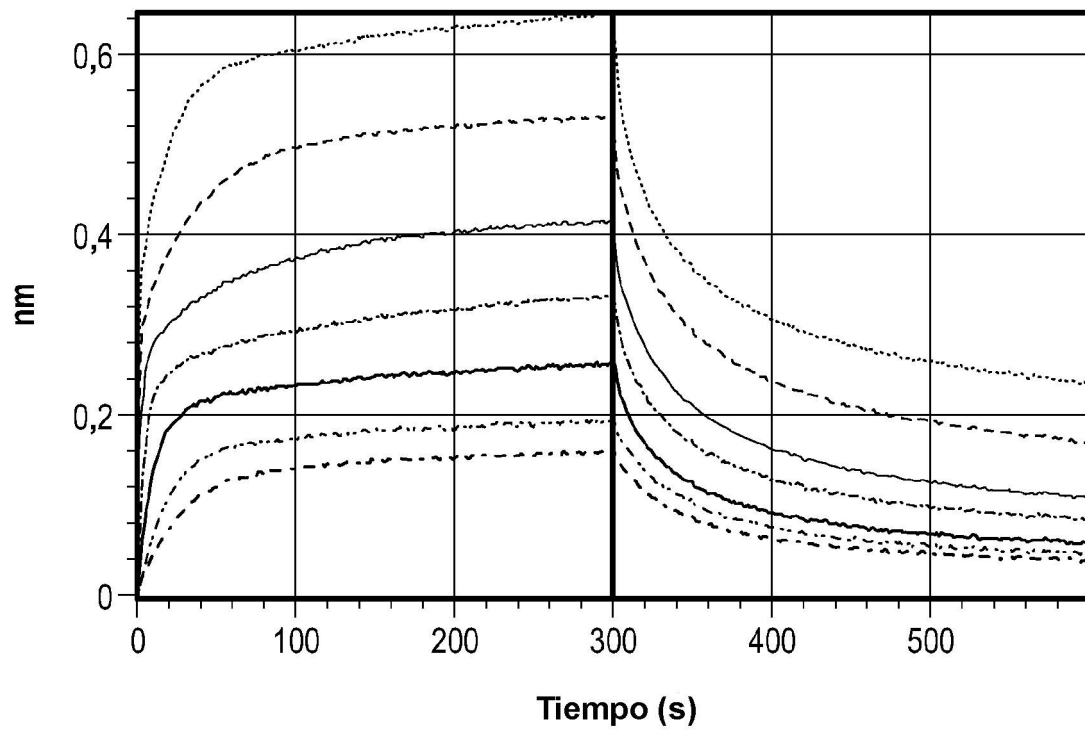


FIG. 12G

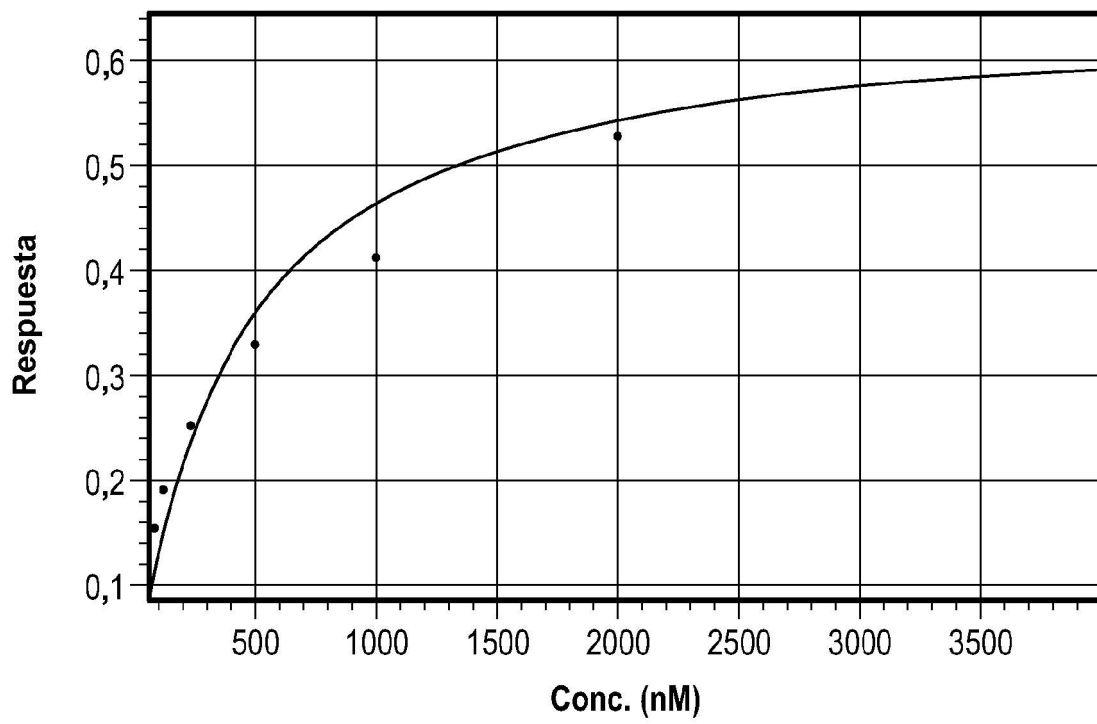


FIG. 12H

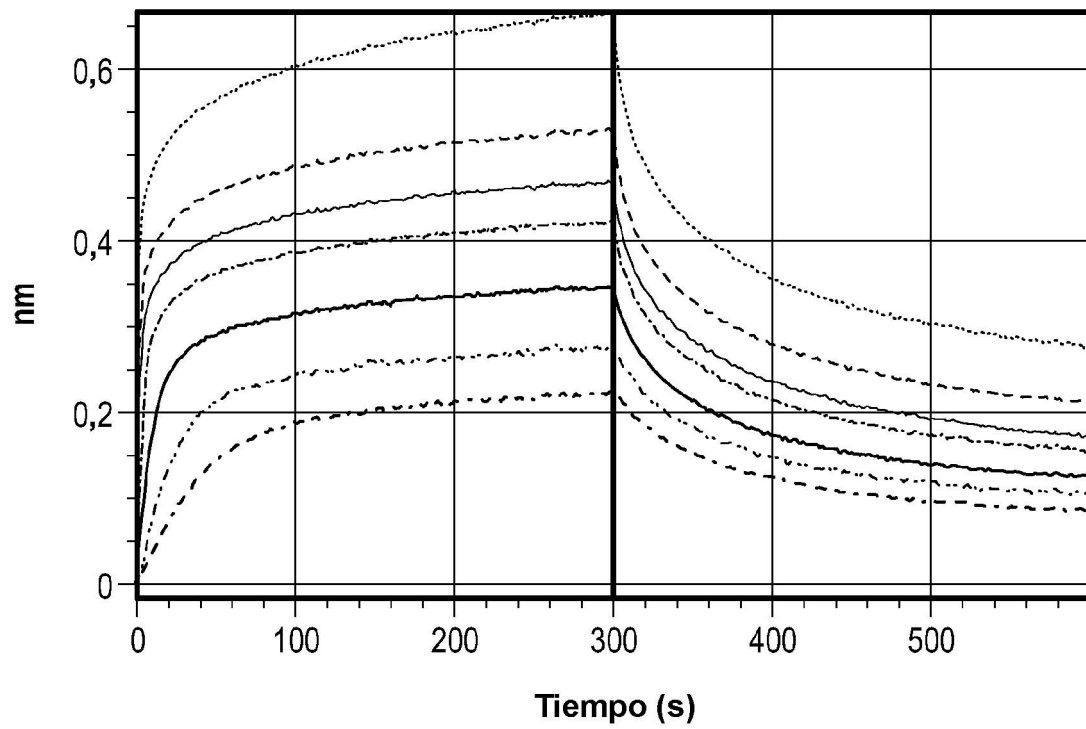


FIG. 12I

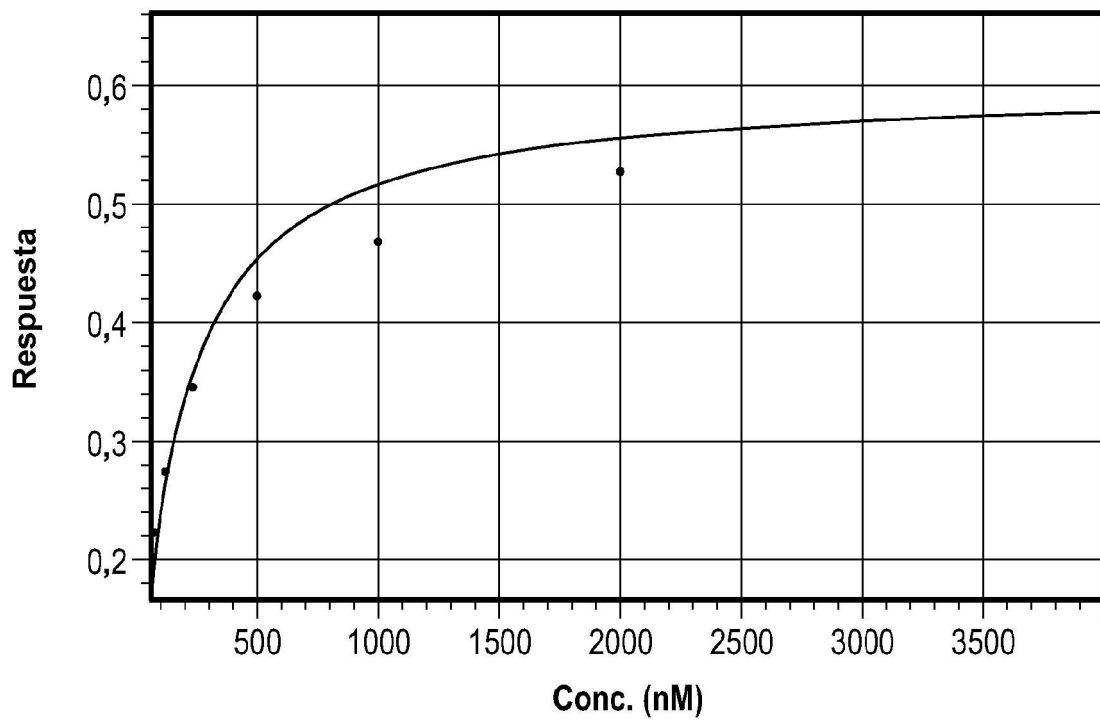


FIG. 12J

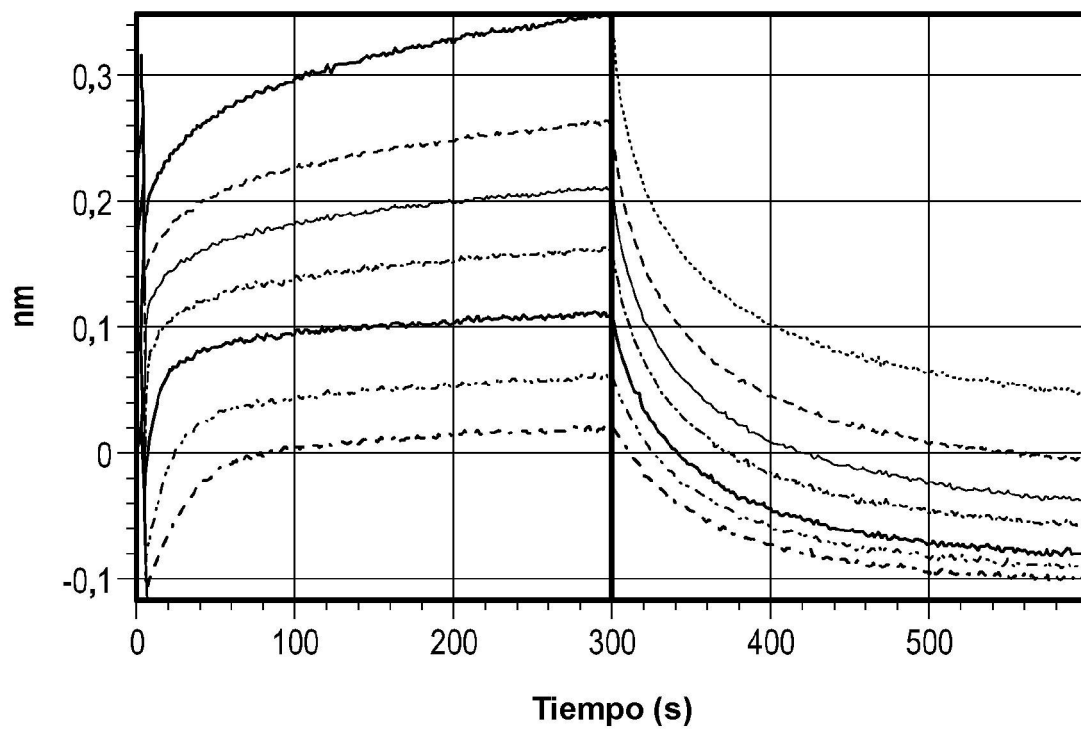


FIG. 12K

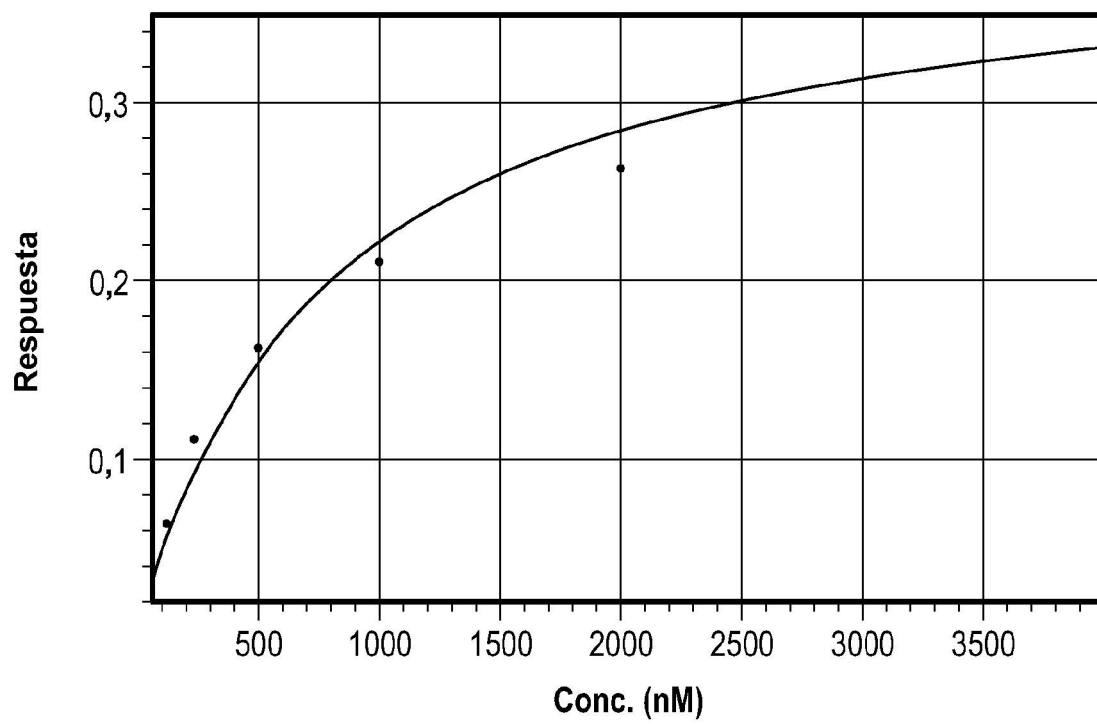


FIG. 12L

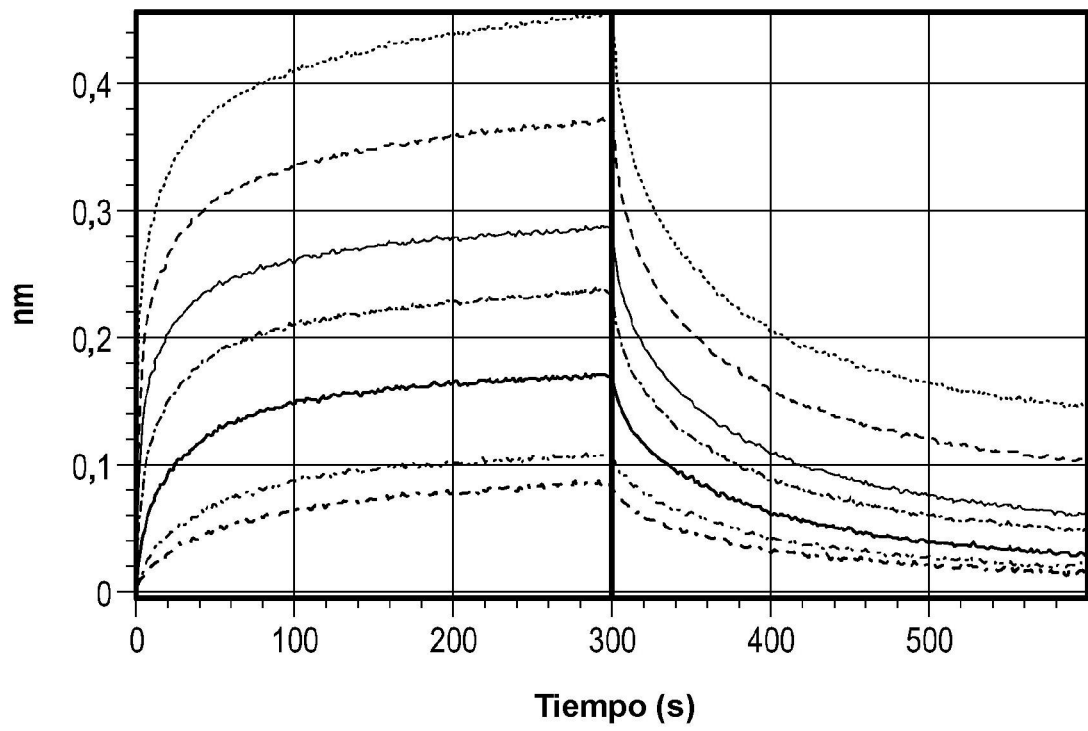


FIG. 12M

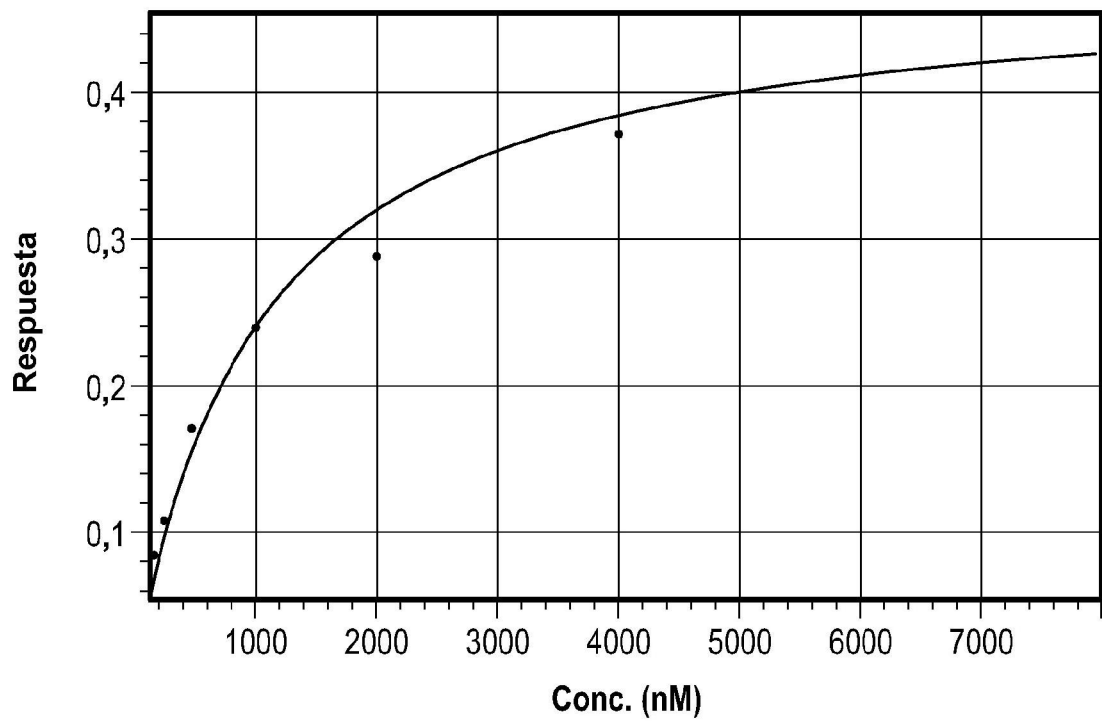


FIG. 12N

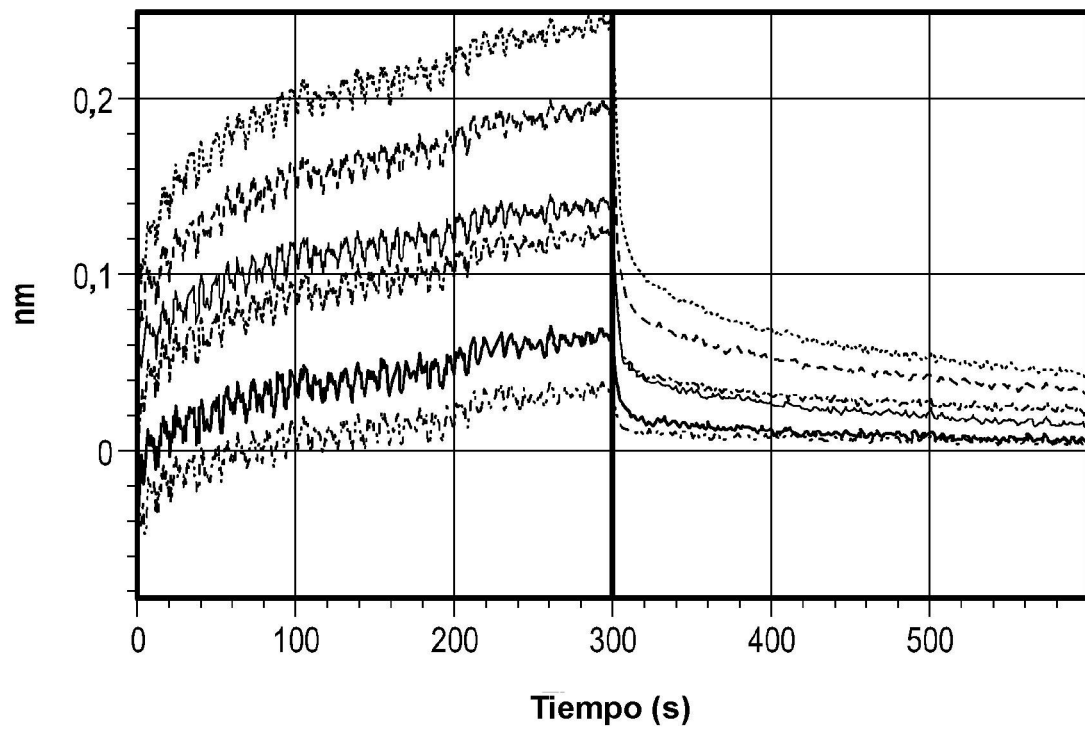


FIG. 120

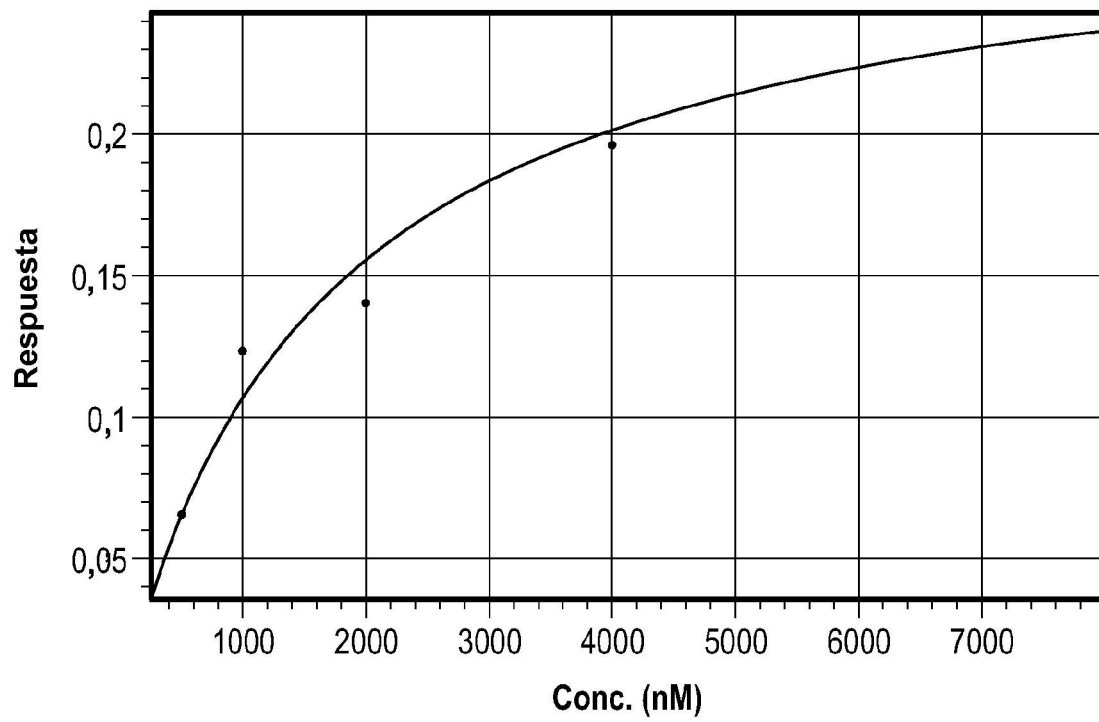


FIG. 12P

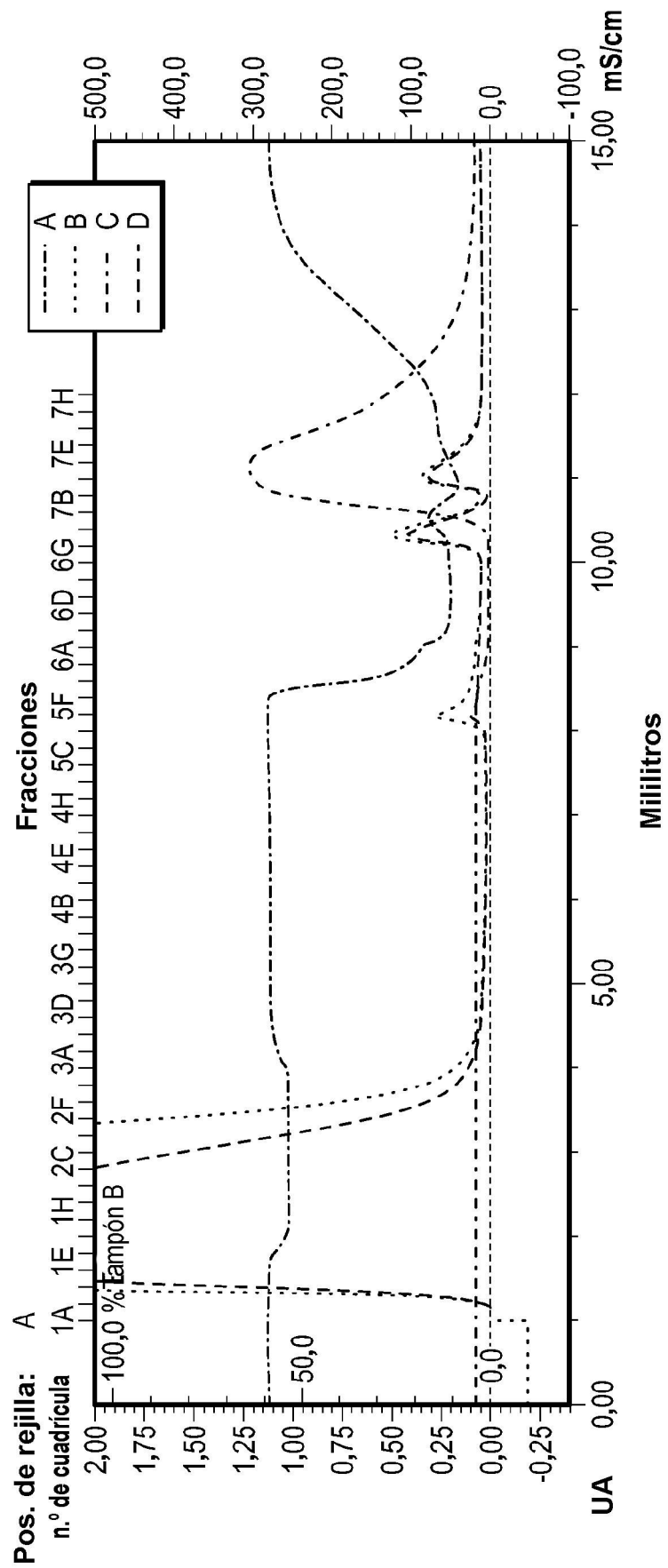


FIG. 13

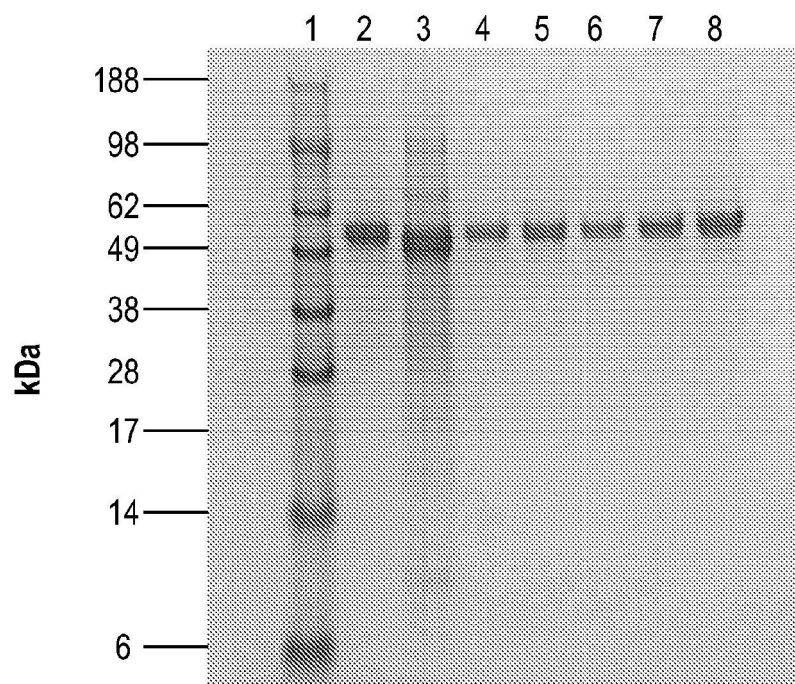


FIG. 14A

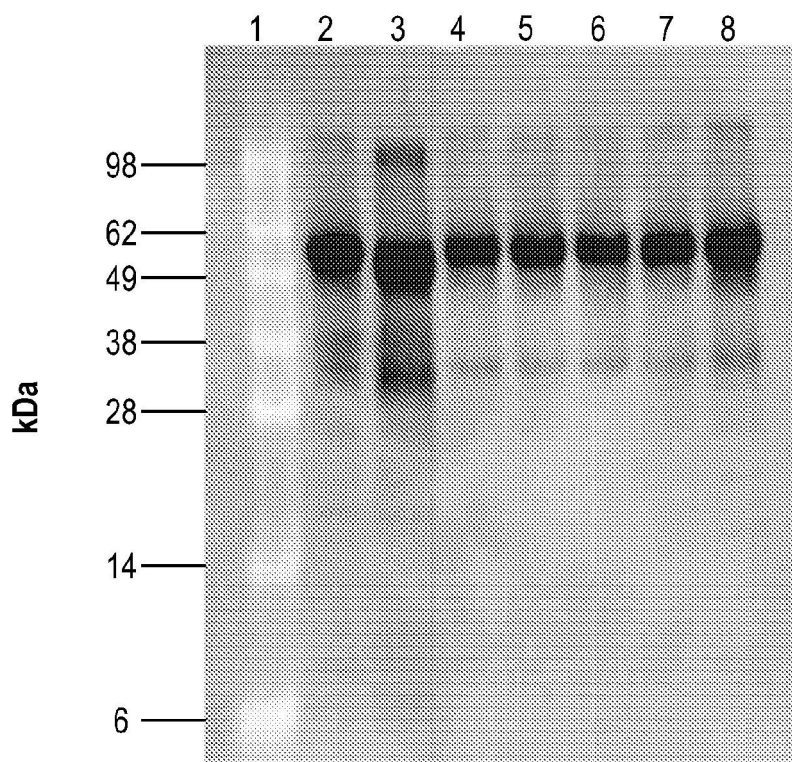


FIG. 14B

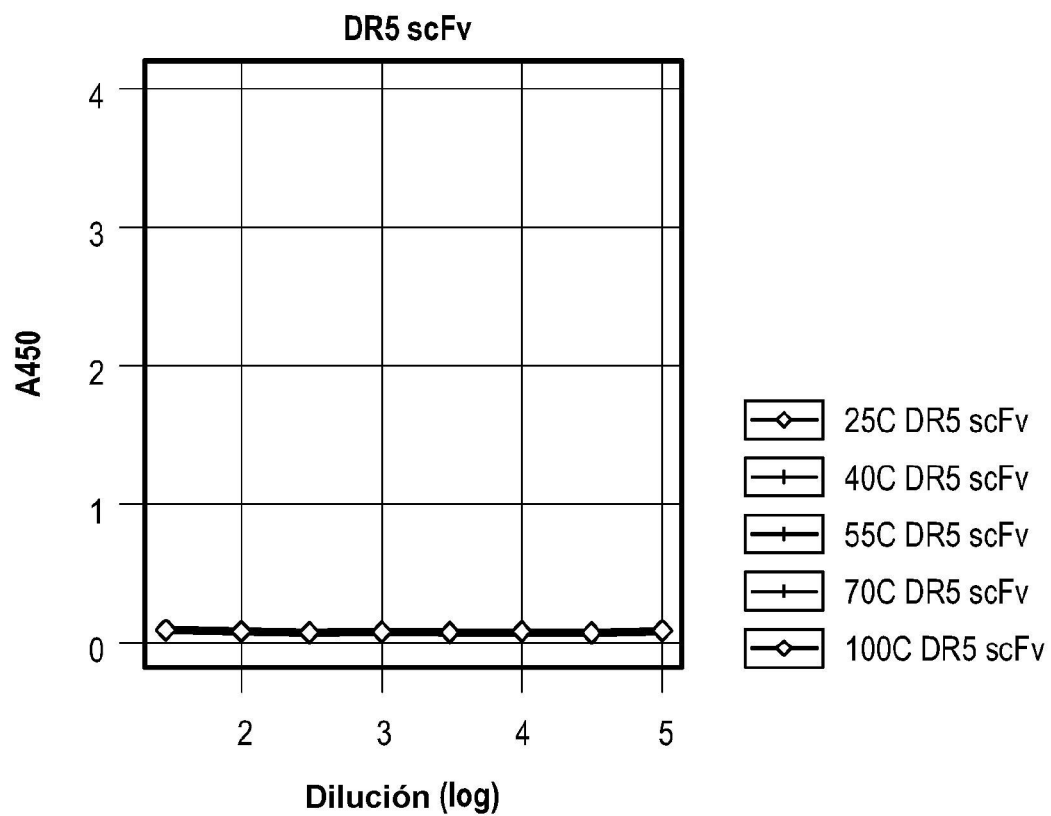


FIG. 15A

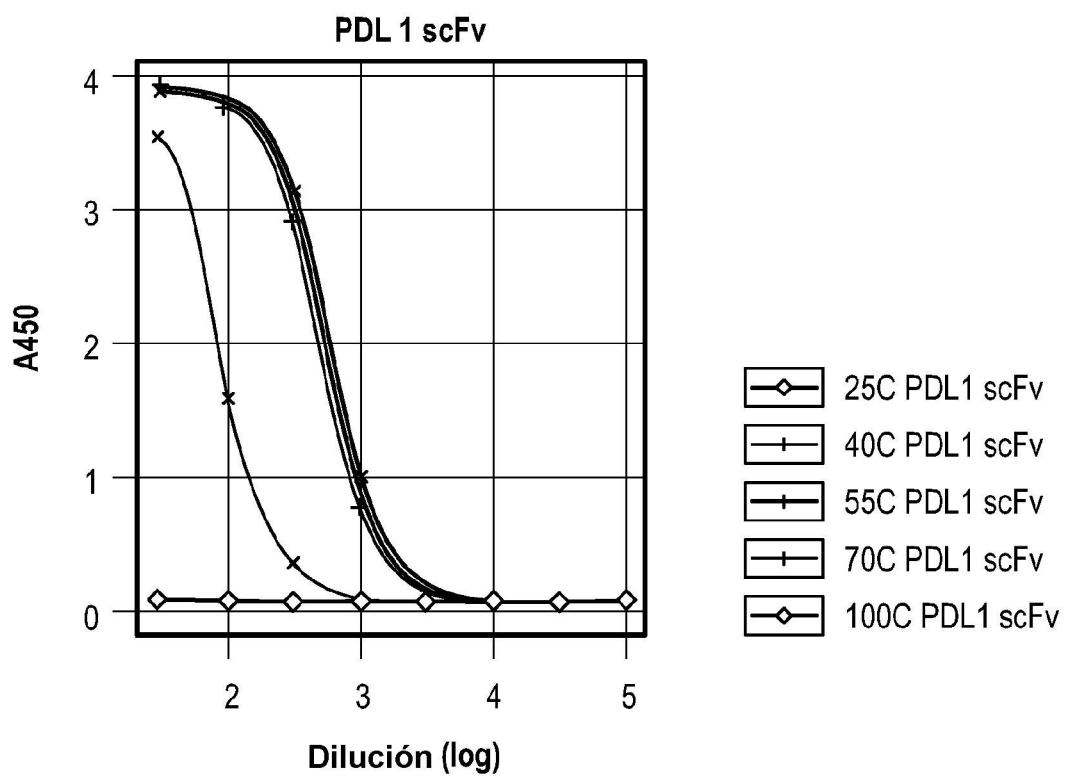


FIG. 15B

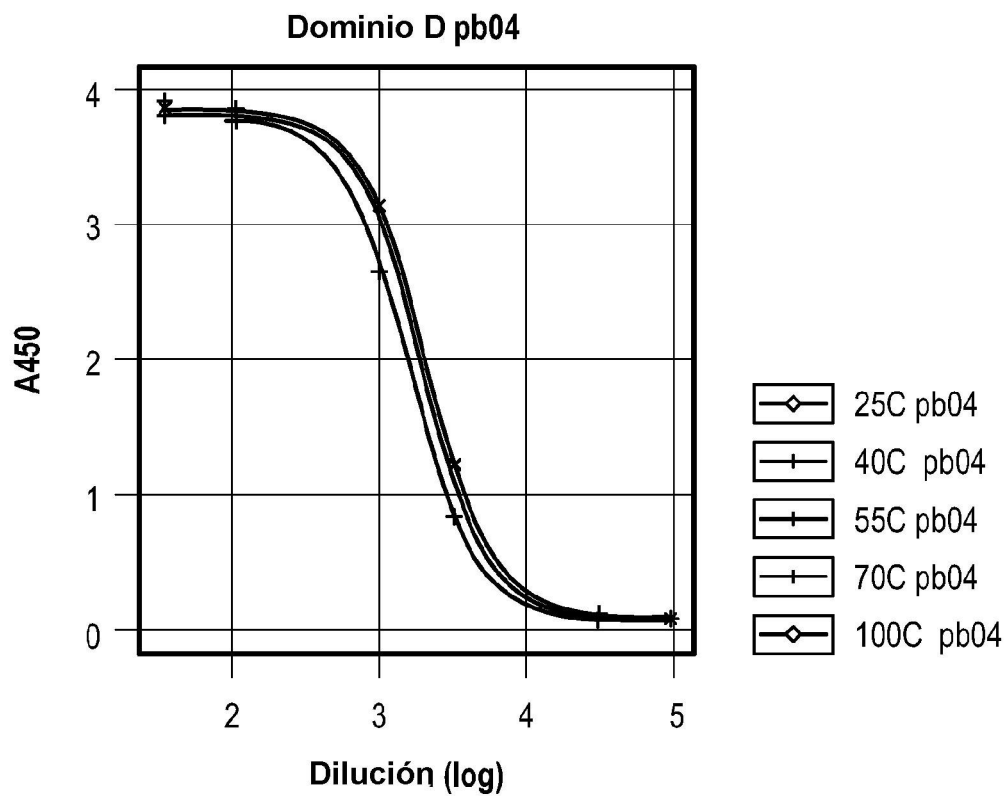


FIG. 15C

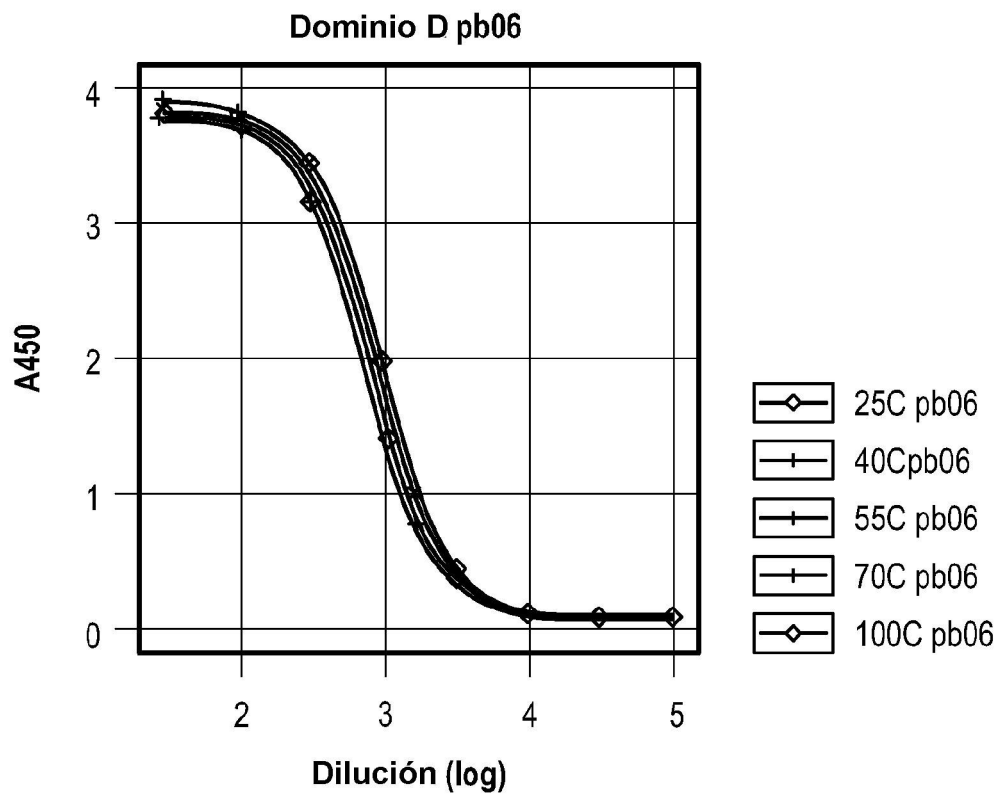


FIG. 15D

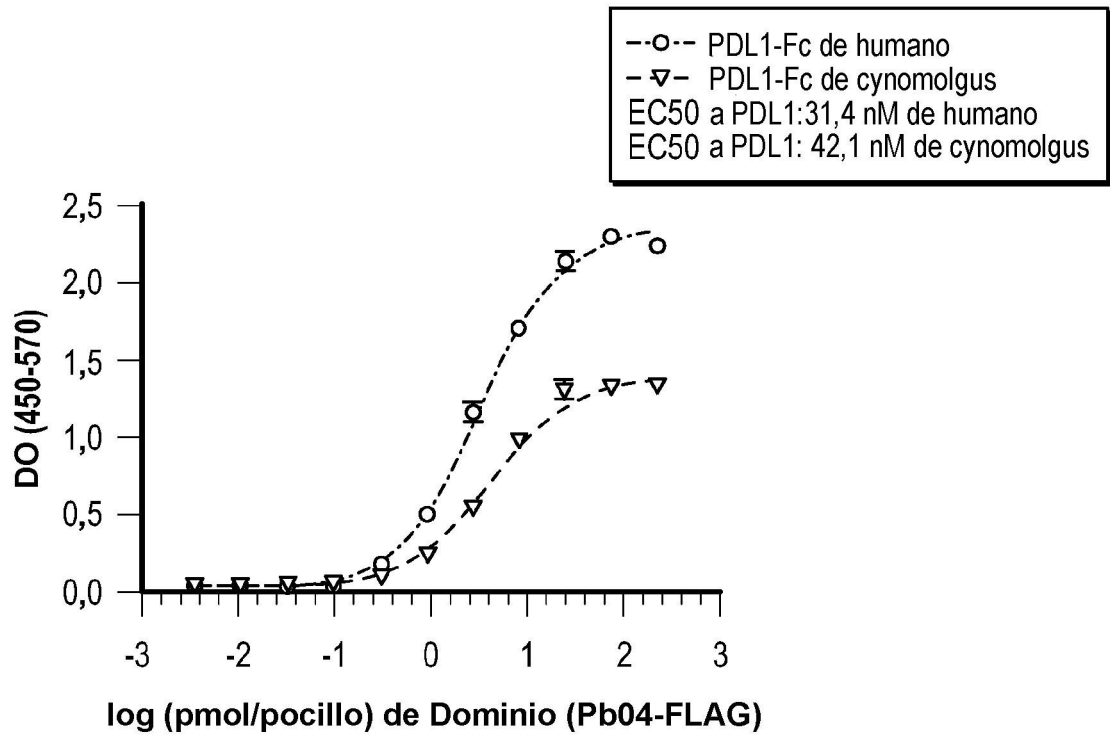


FIG. 16A

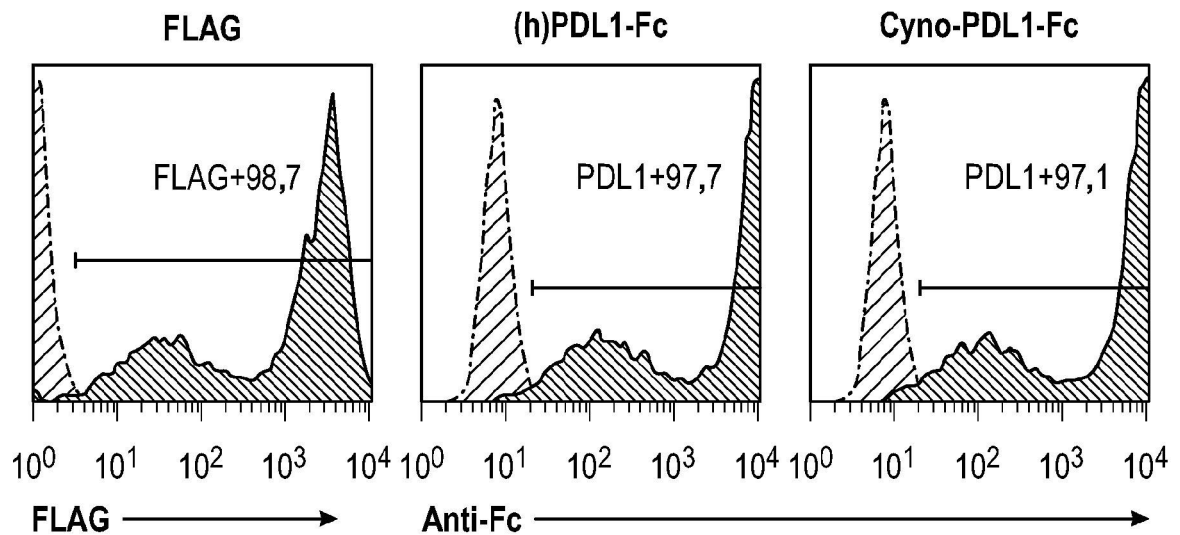


FIG. 16B

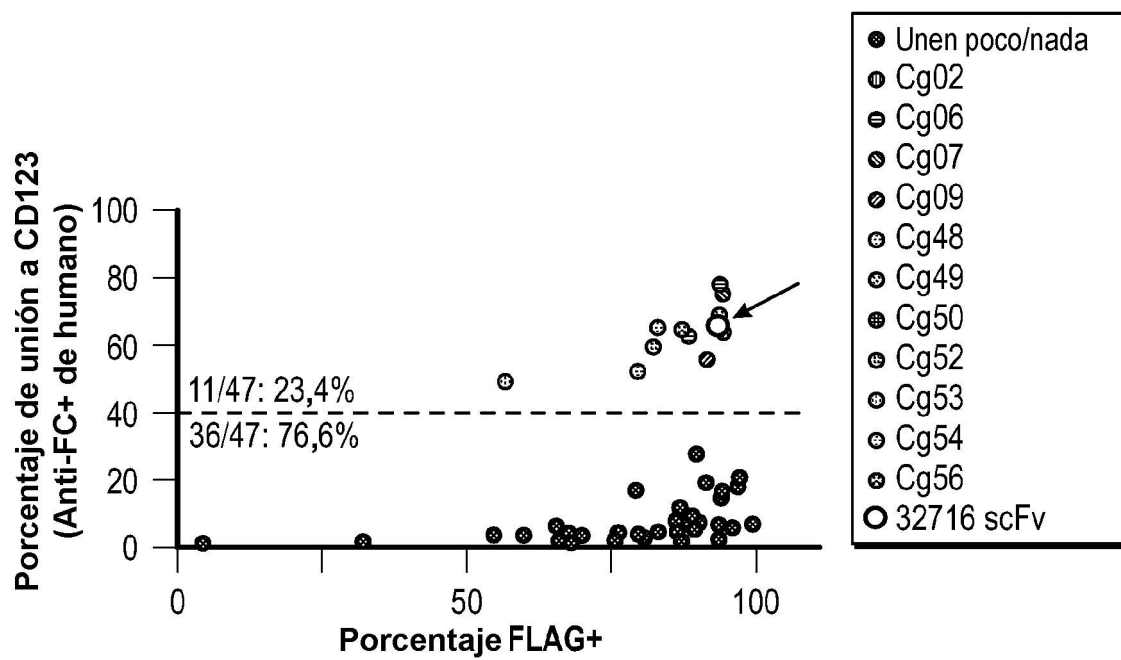


FIG. 17

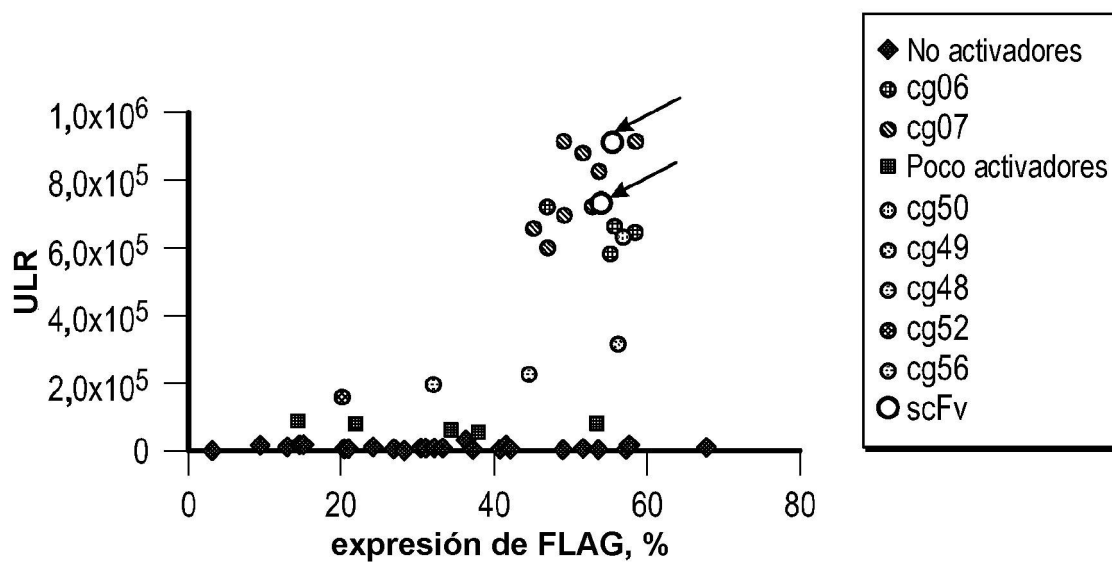


FIG. 18

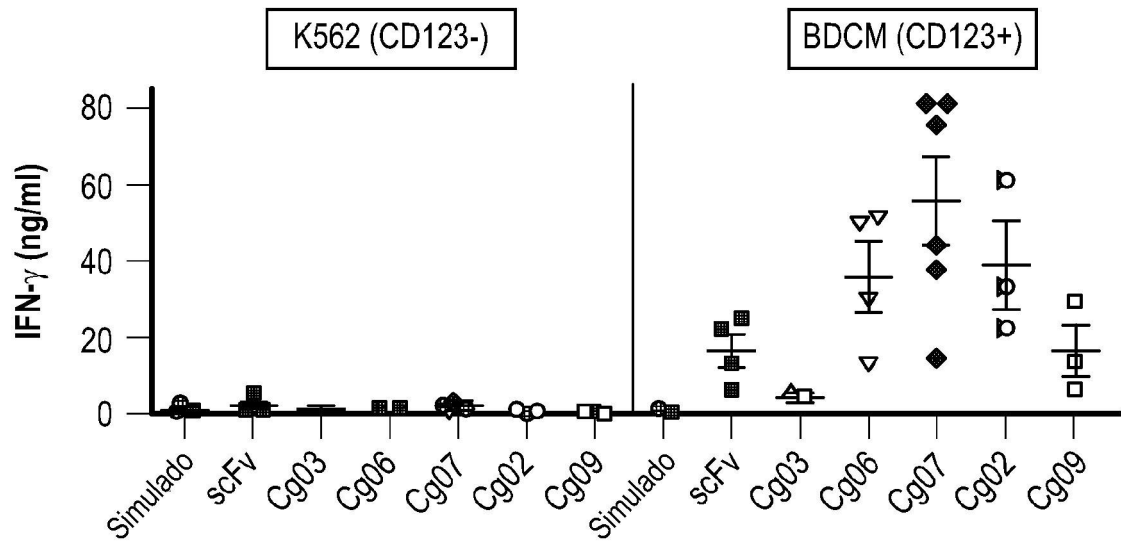


FIG. 19A

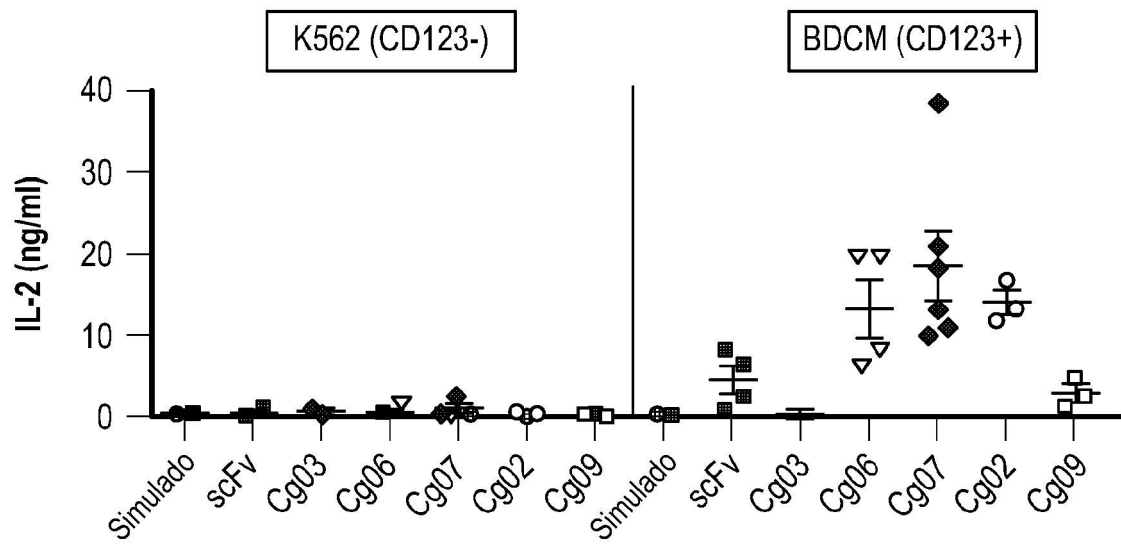


FIG. 19B

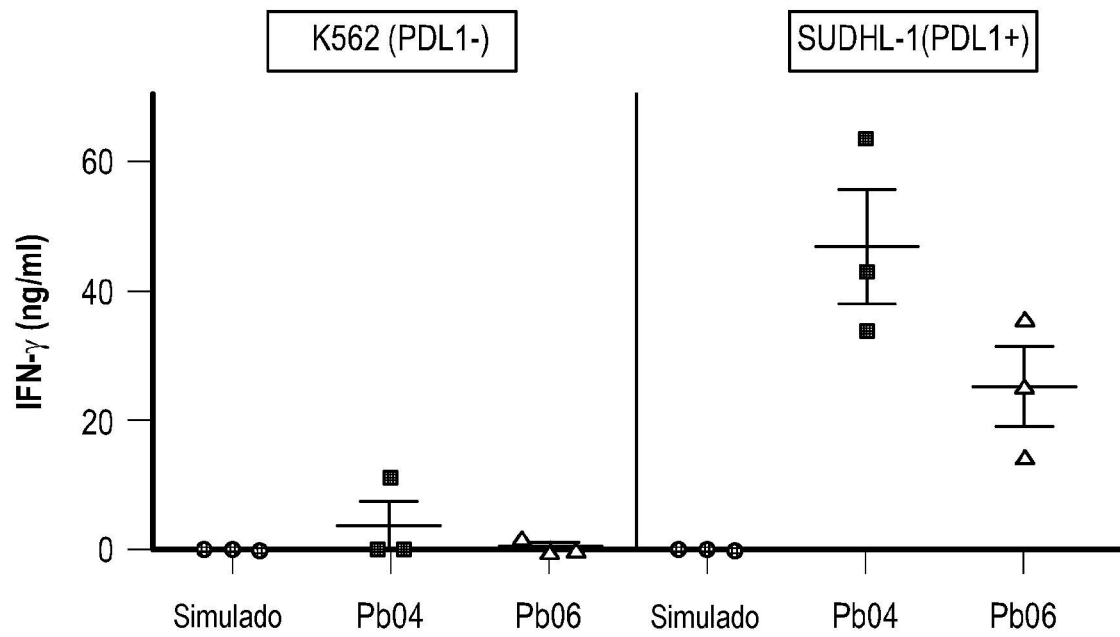


FIG. 20A

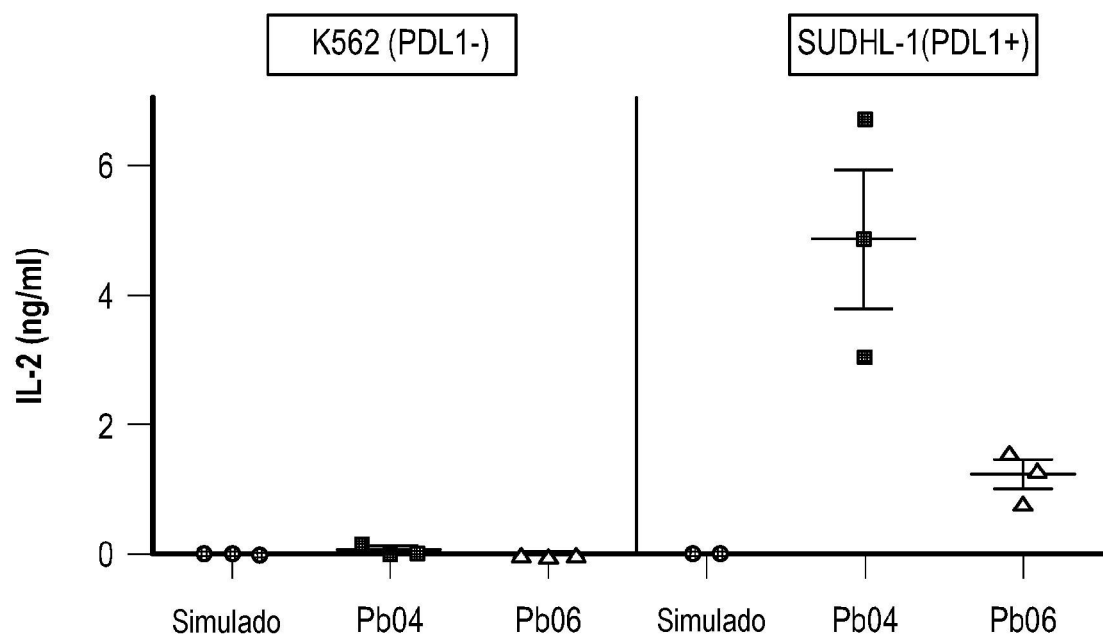


FIG. 20B

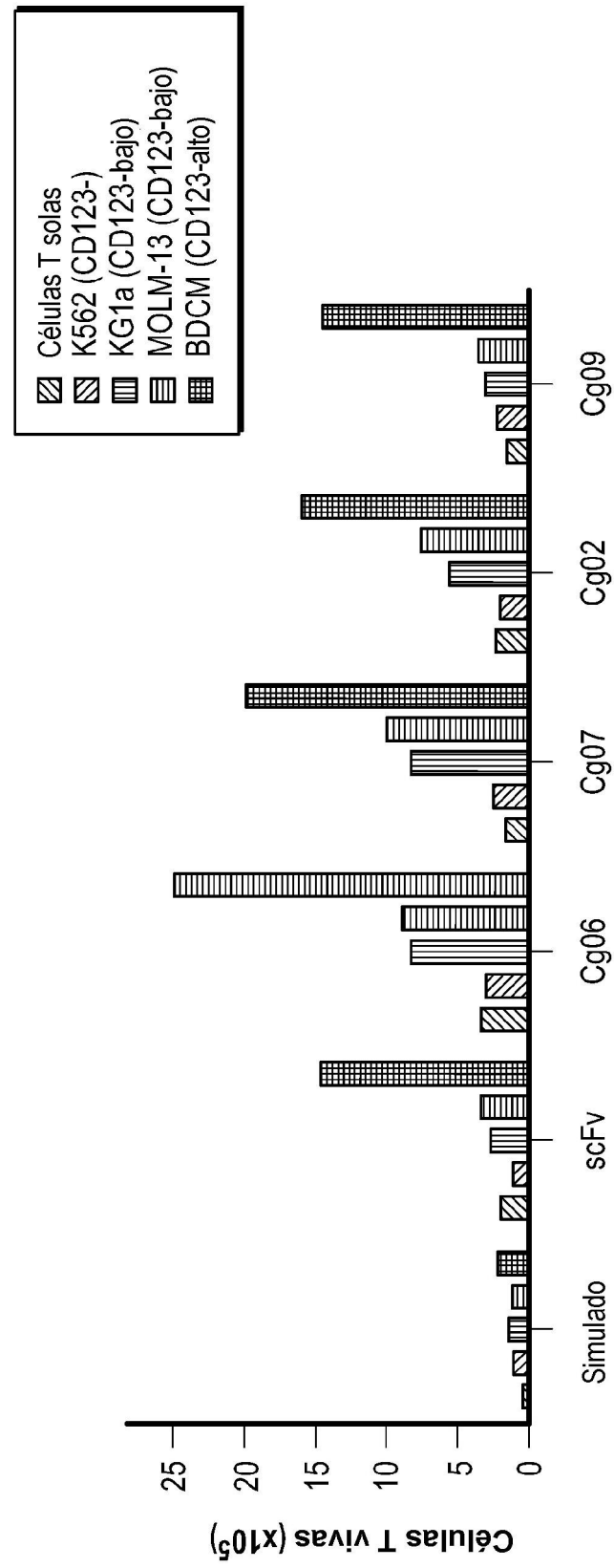


FIG. 21

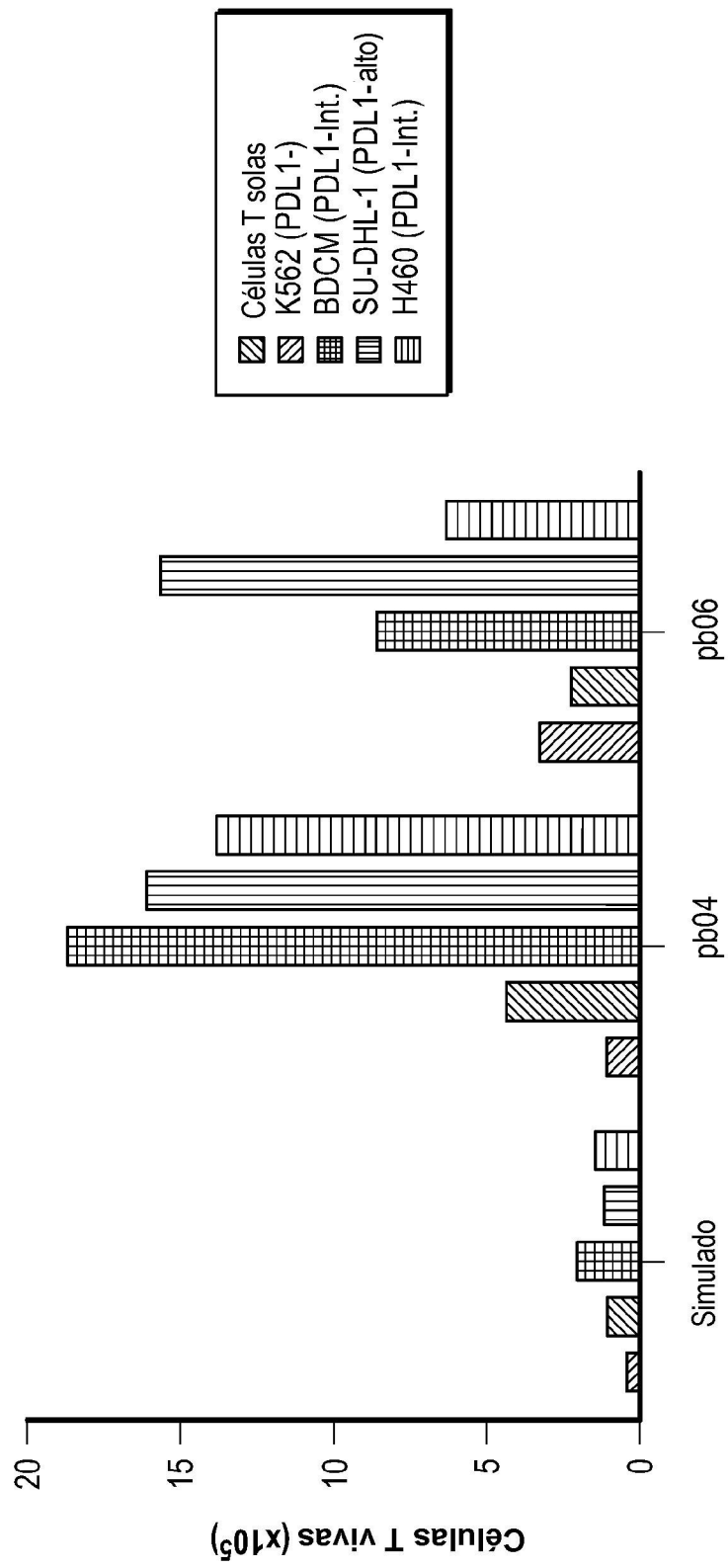


FIG. 22

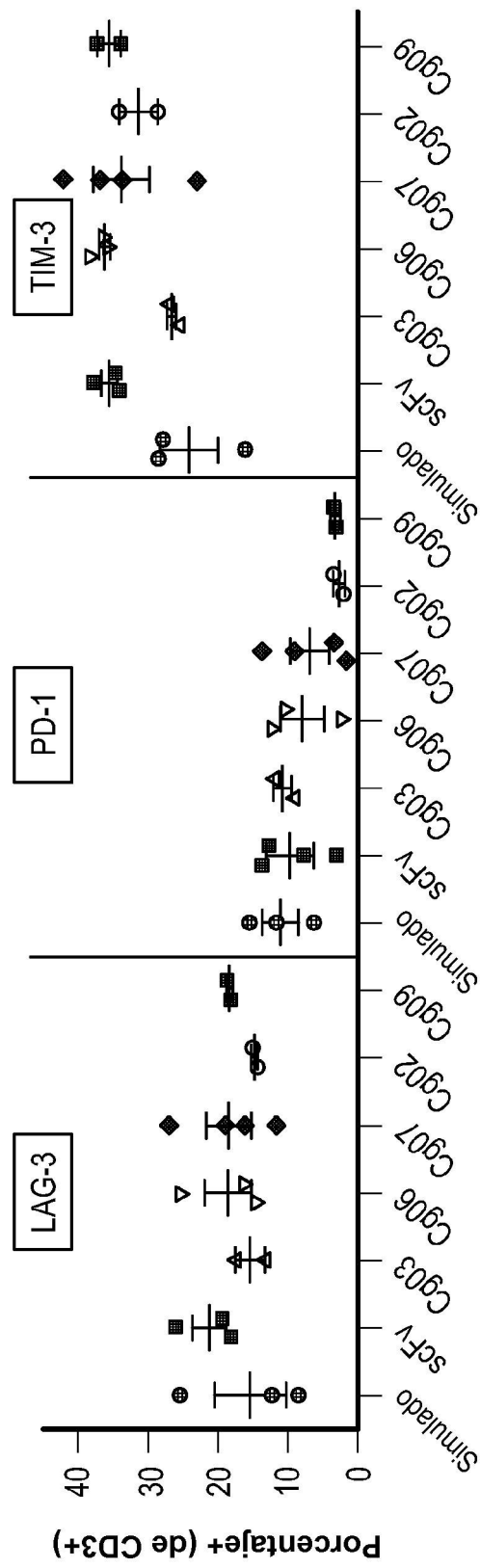


FIG. 23A

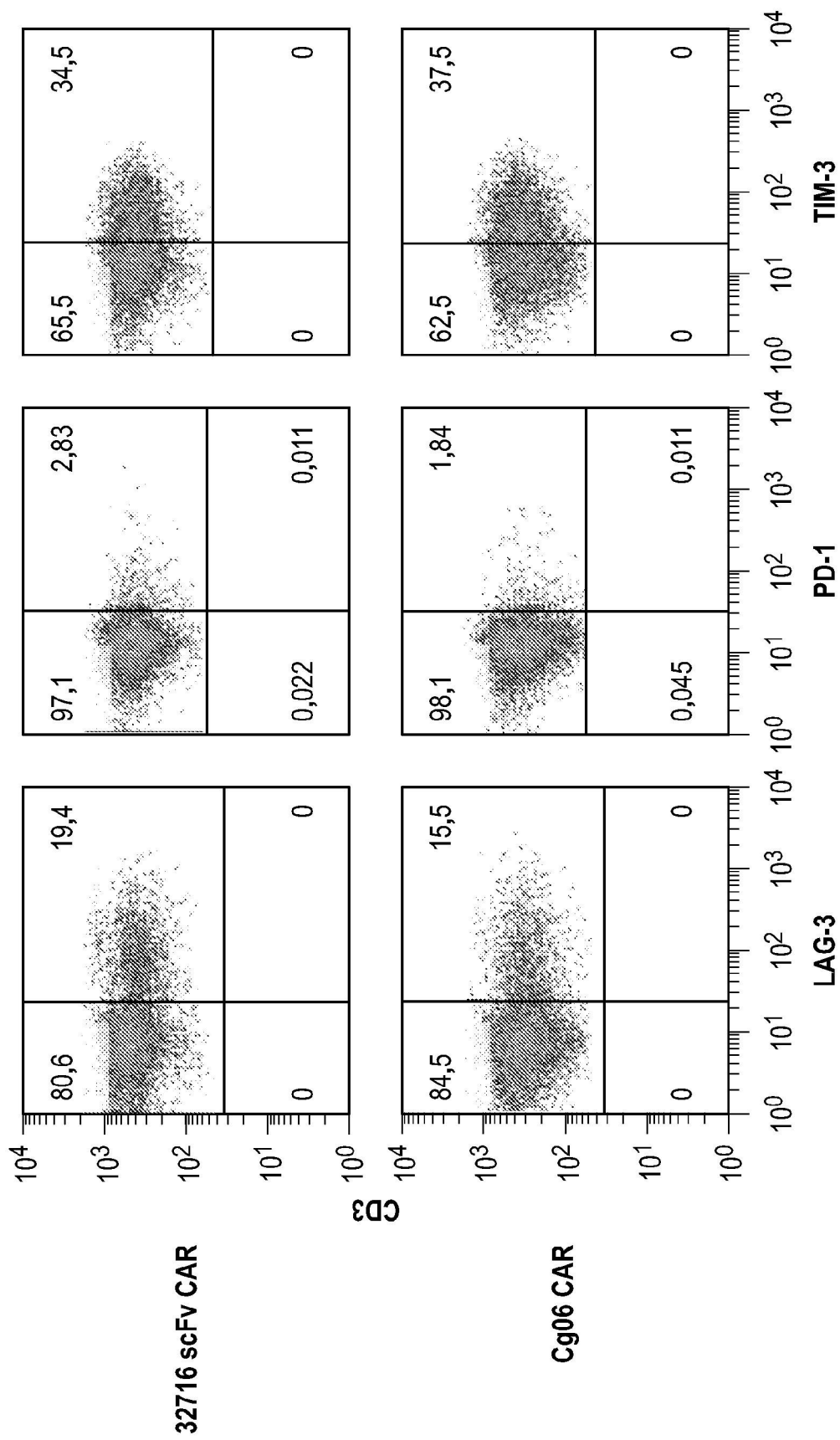


FIG. 23B

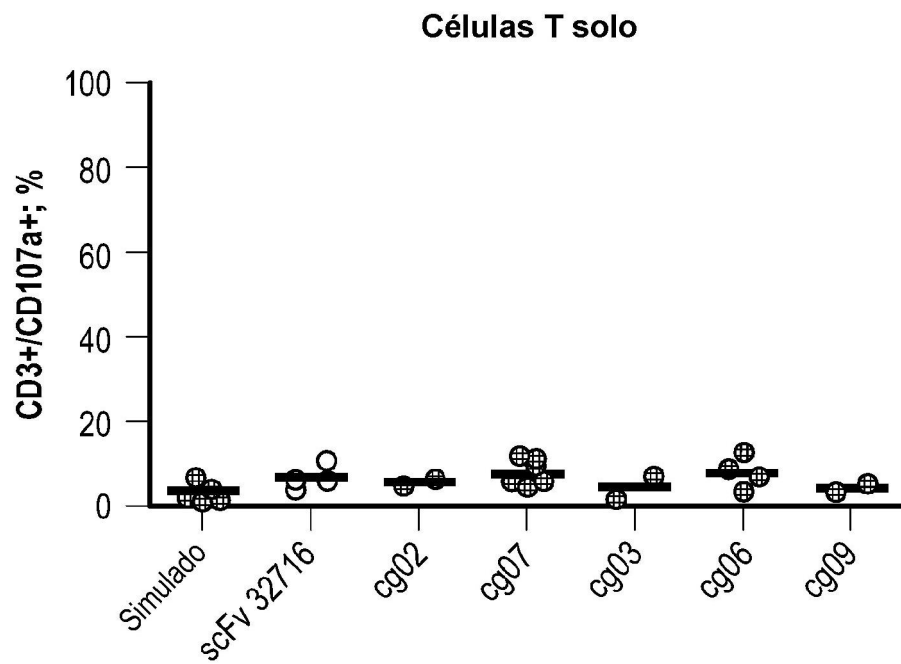


FIG. 24A

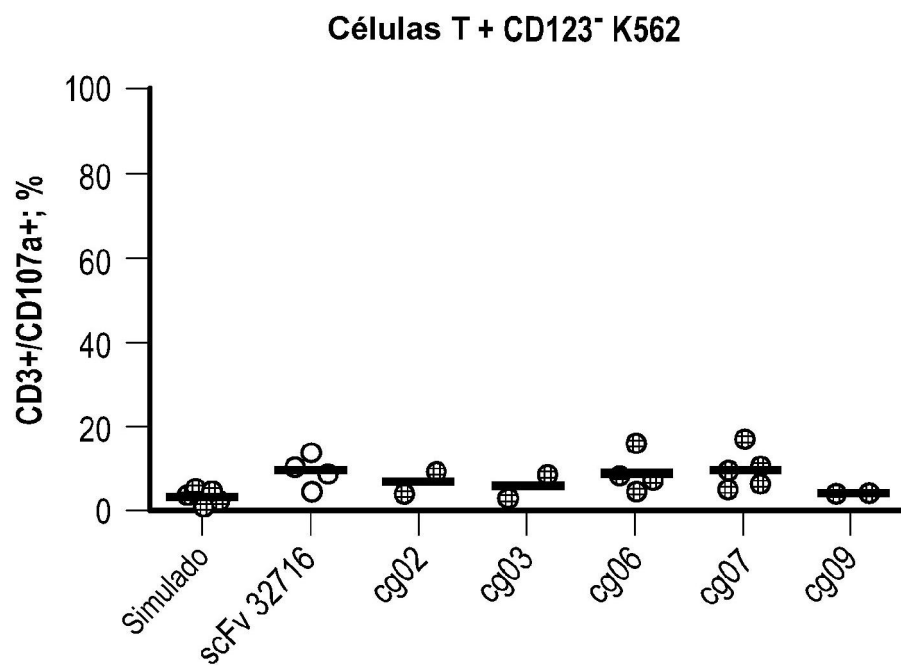


FIG. 24B

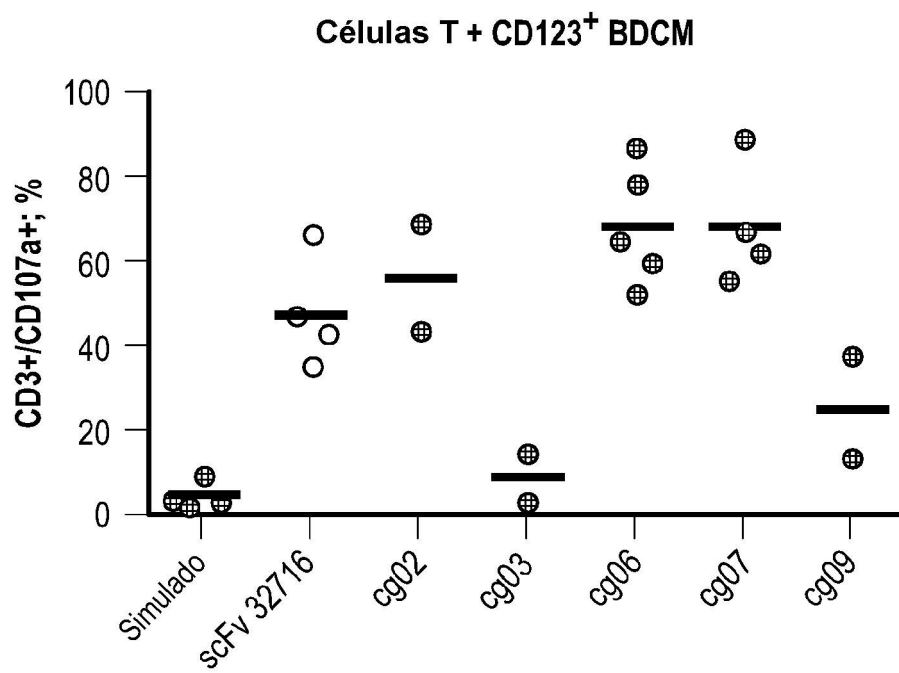


FIG. 24C

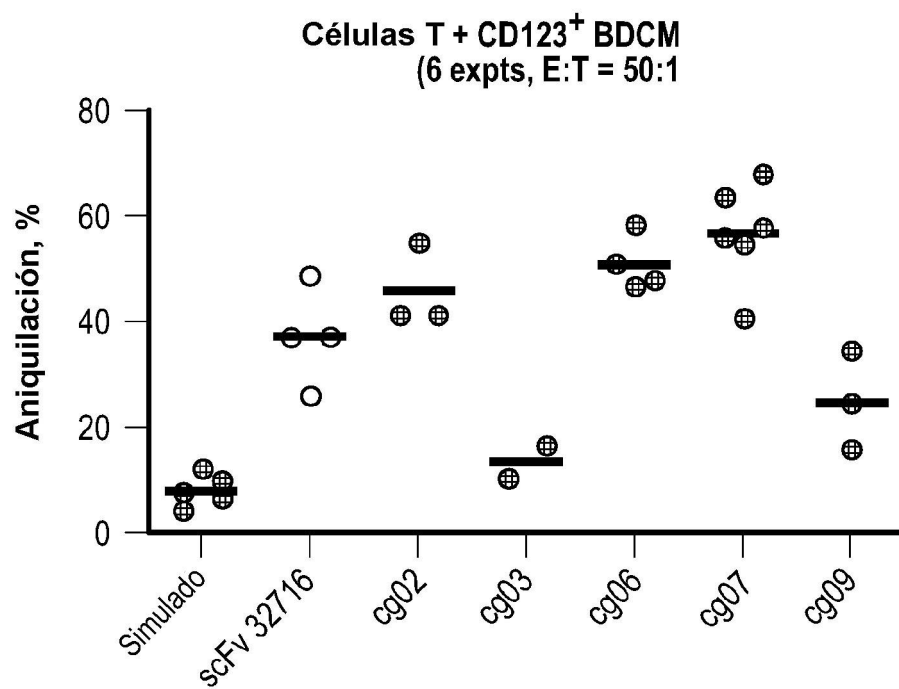


FIG. 24D

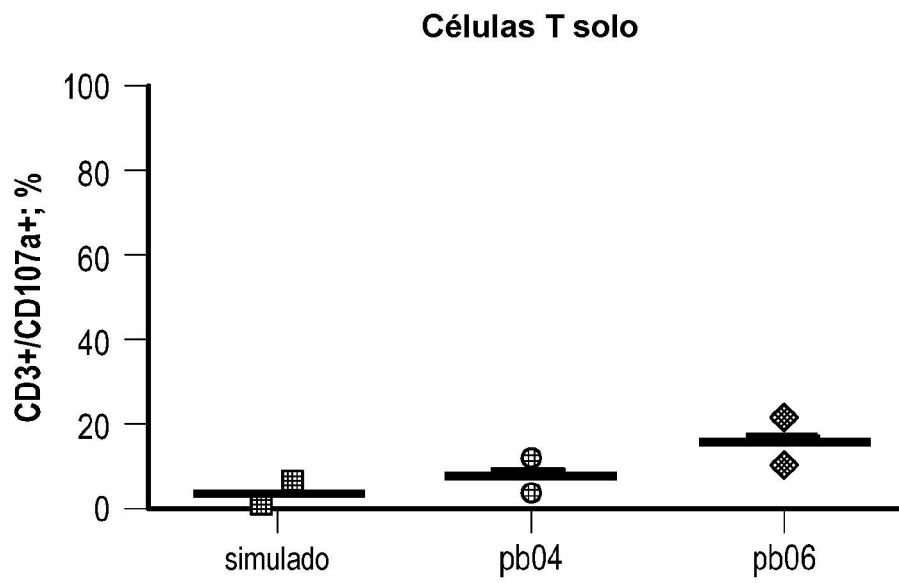


FIG. 25A

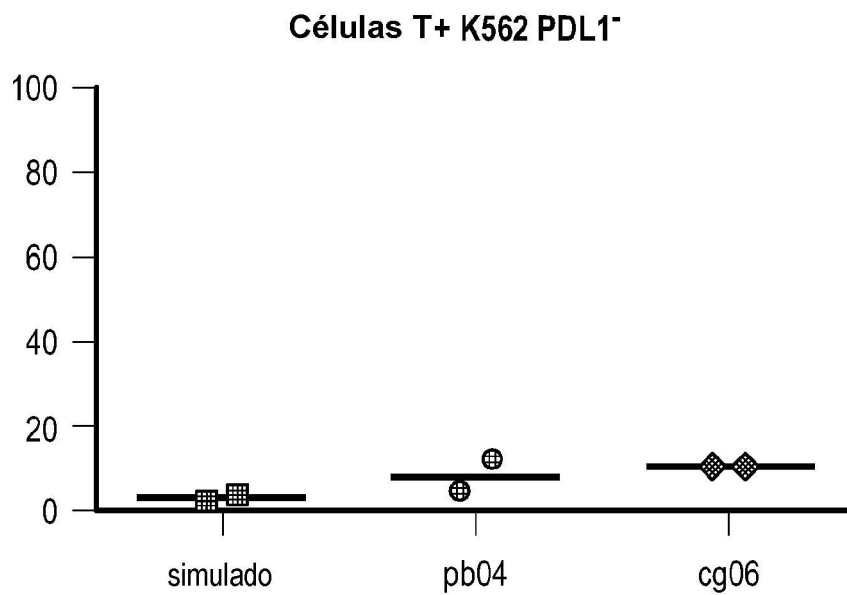


FIG. 25B

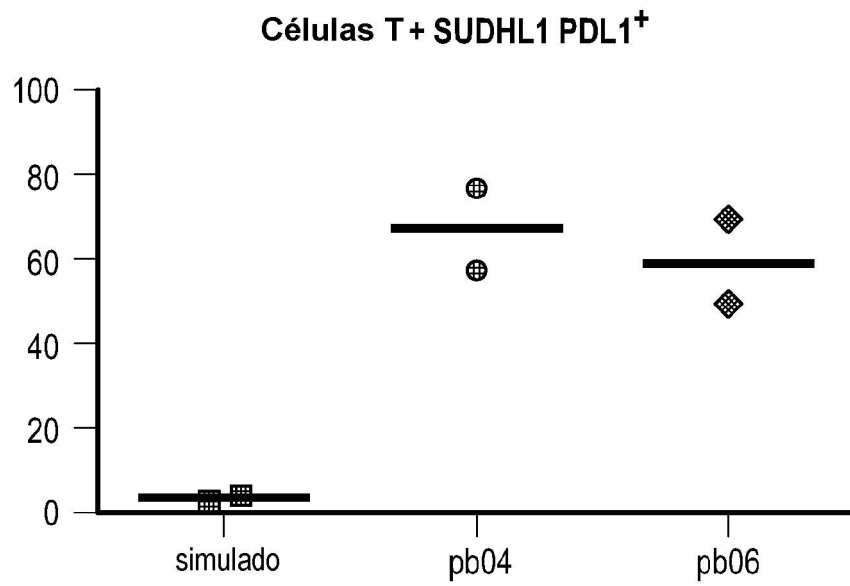


FIG. 25C

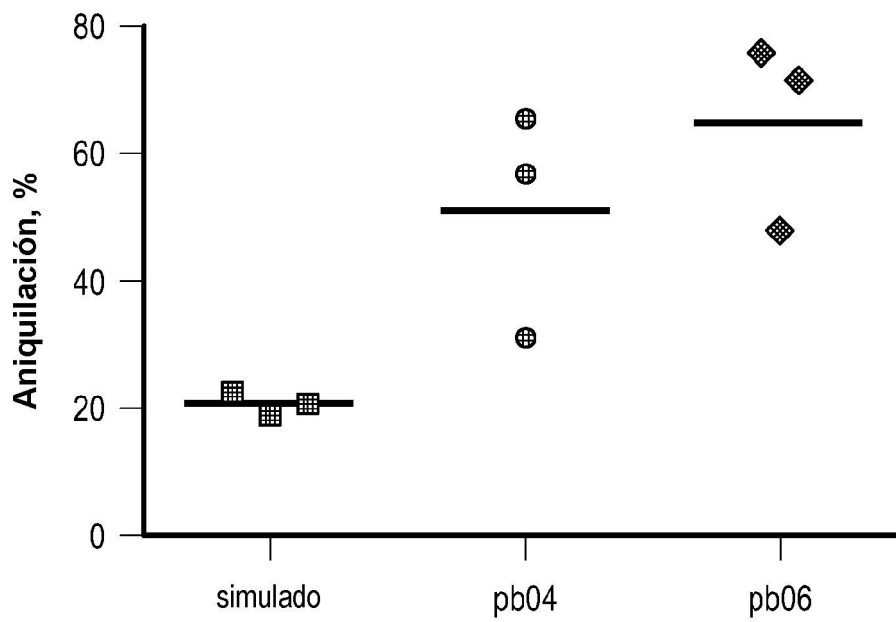


FIG. 25D

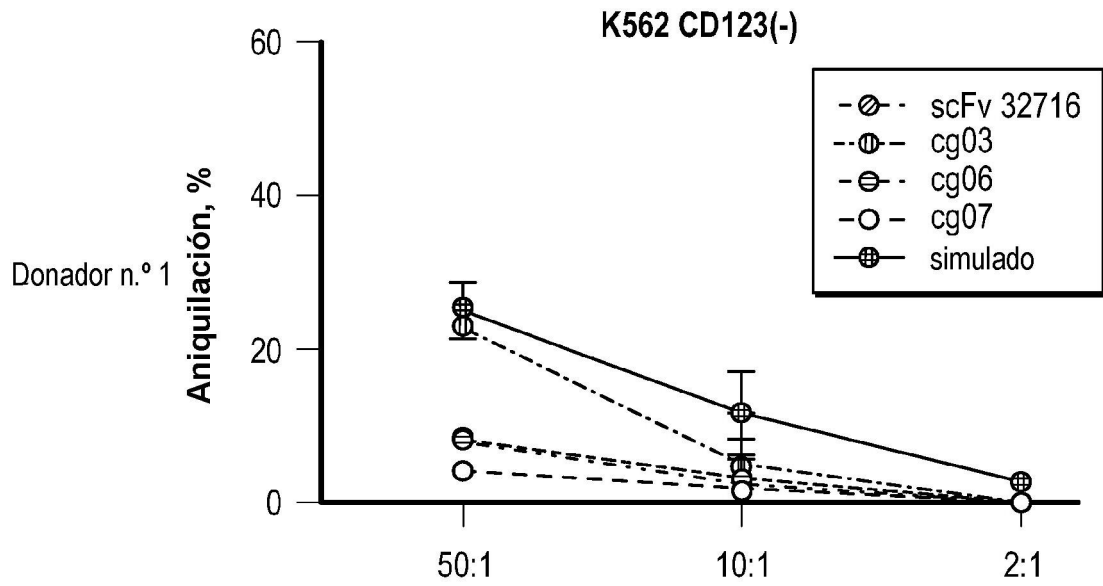


FIG. 26A

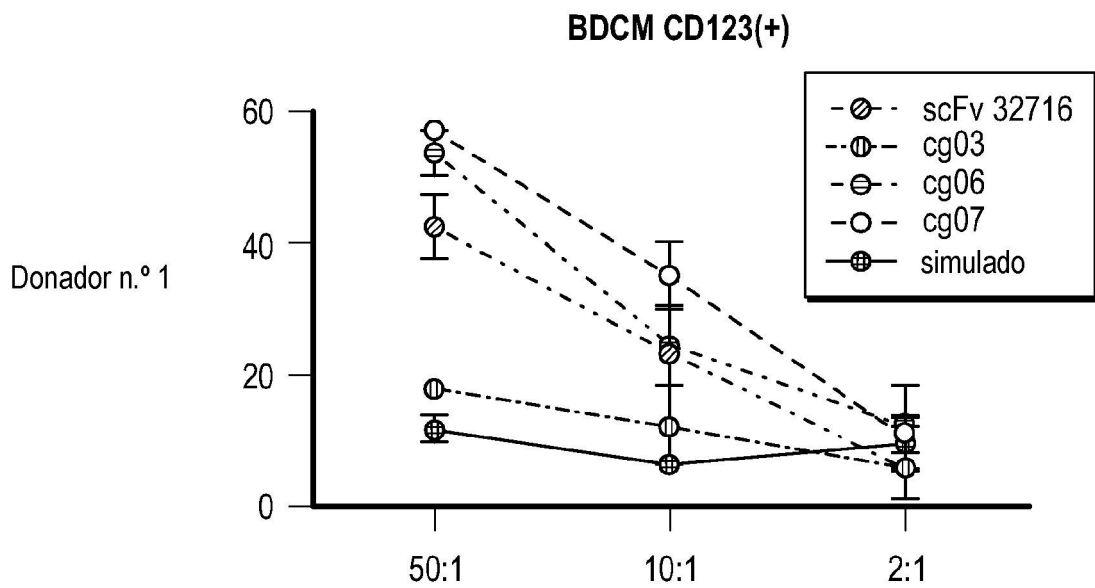


FIG. 26B

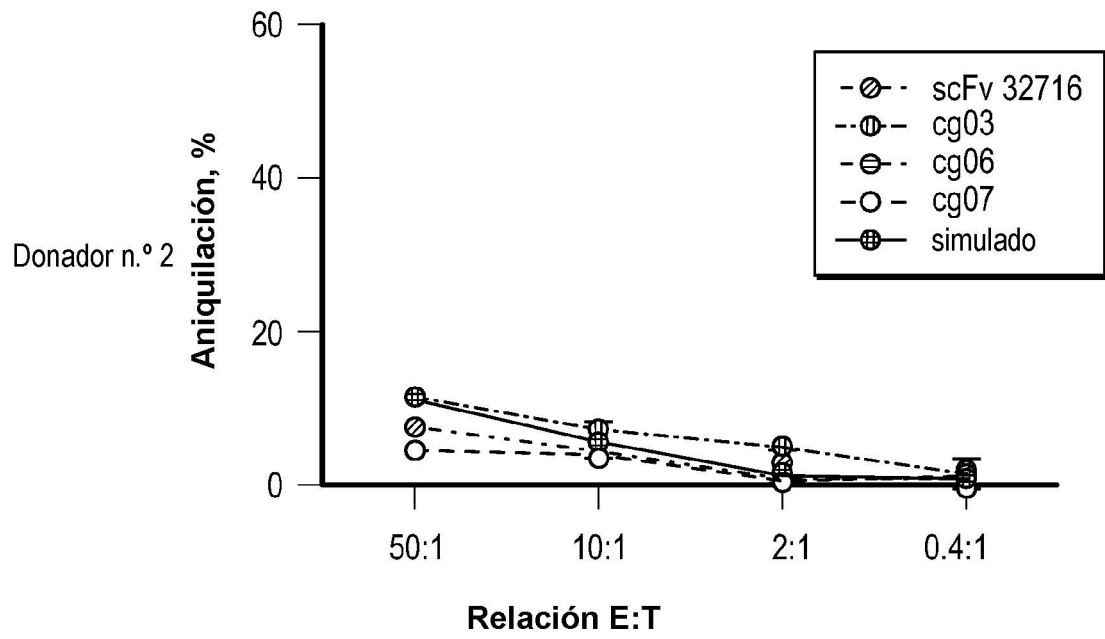


FIG. 26C

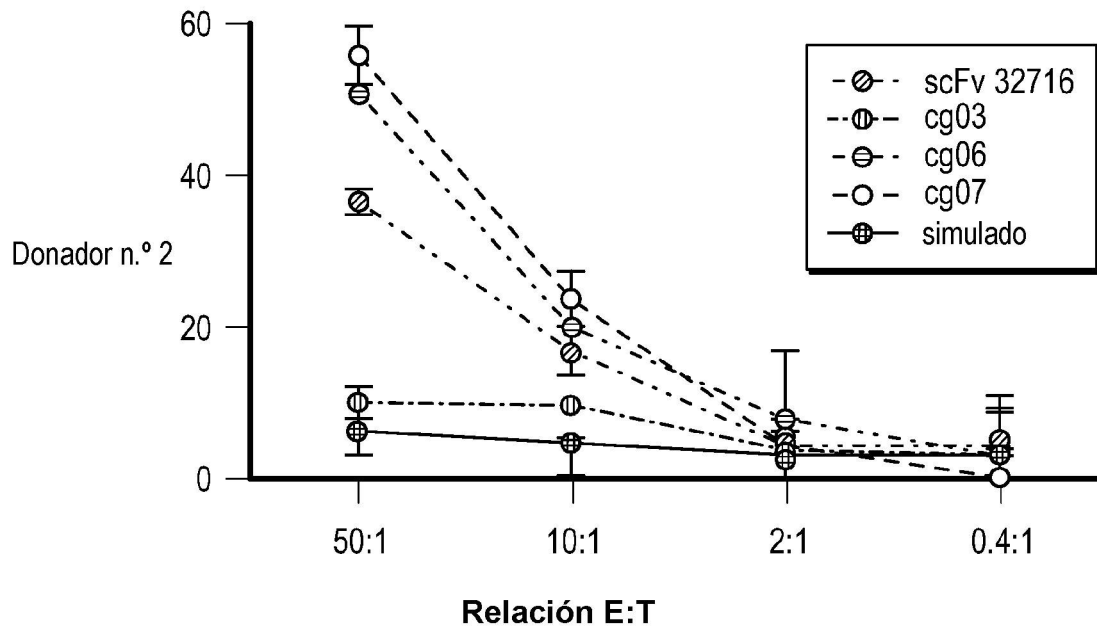


FIG. 26D

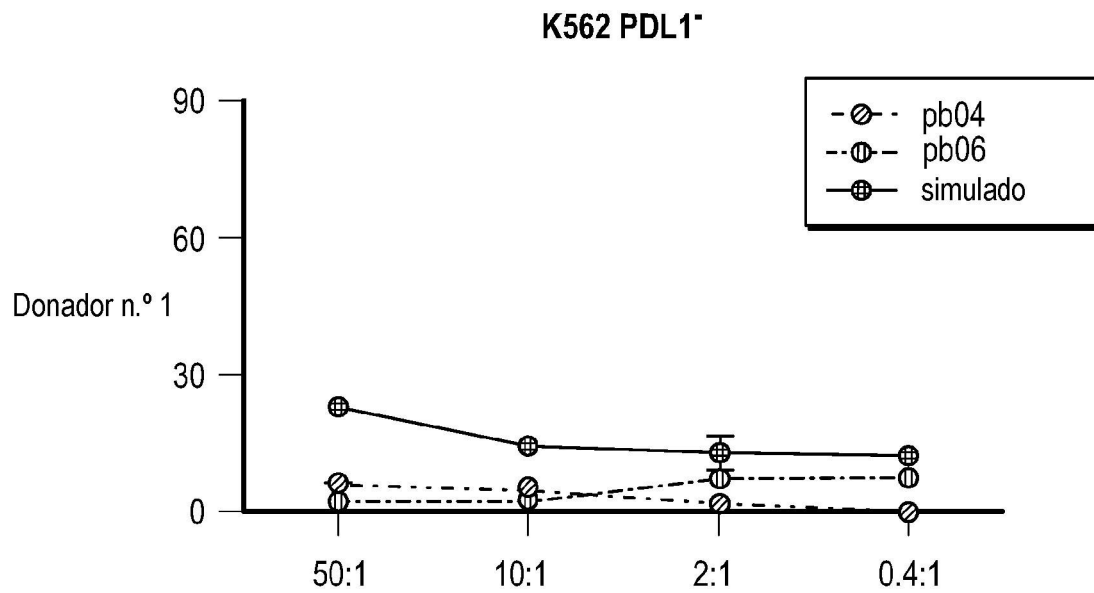


FIG. 27A

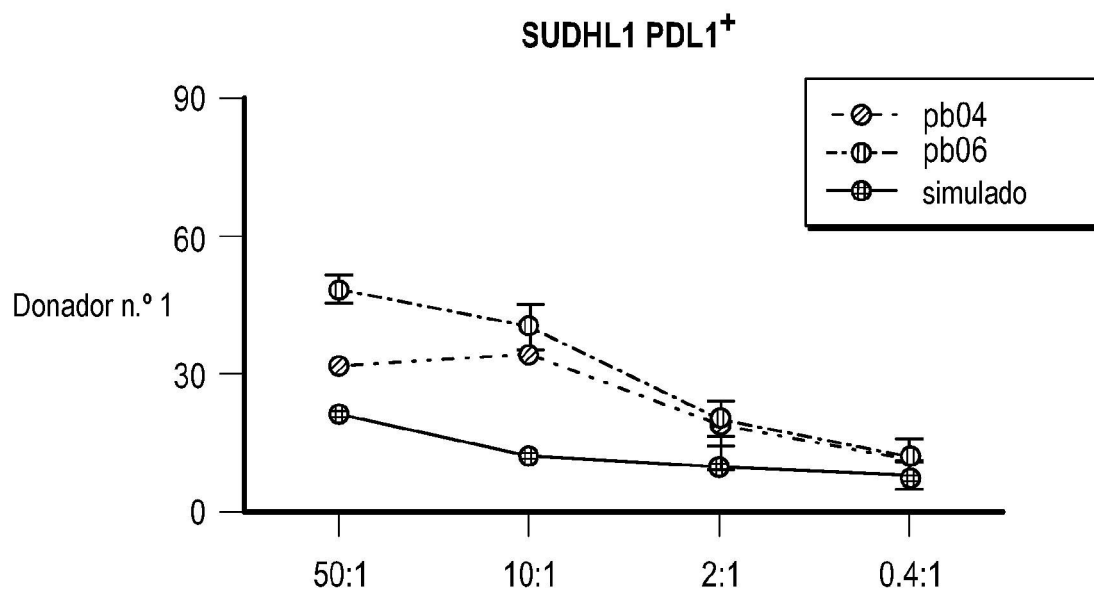


FIG. 27B

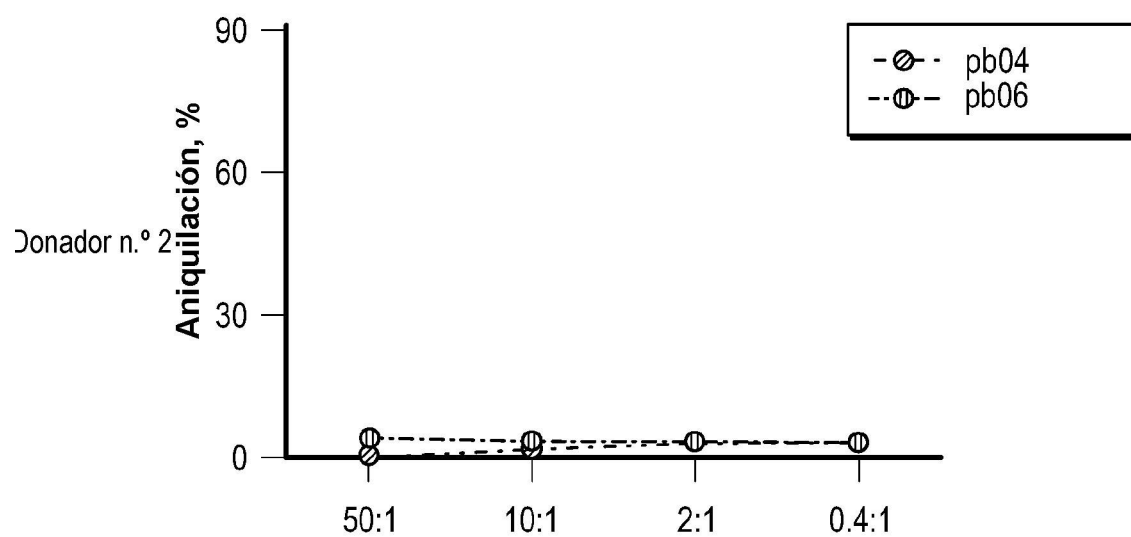


FIG. 27C

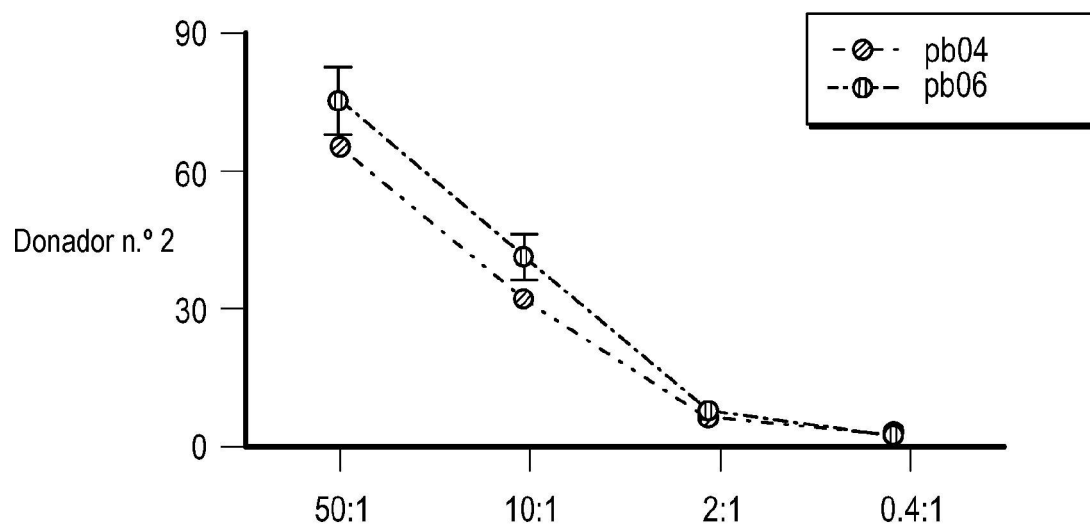


FIG. 27D

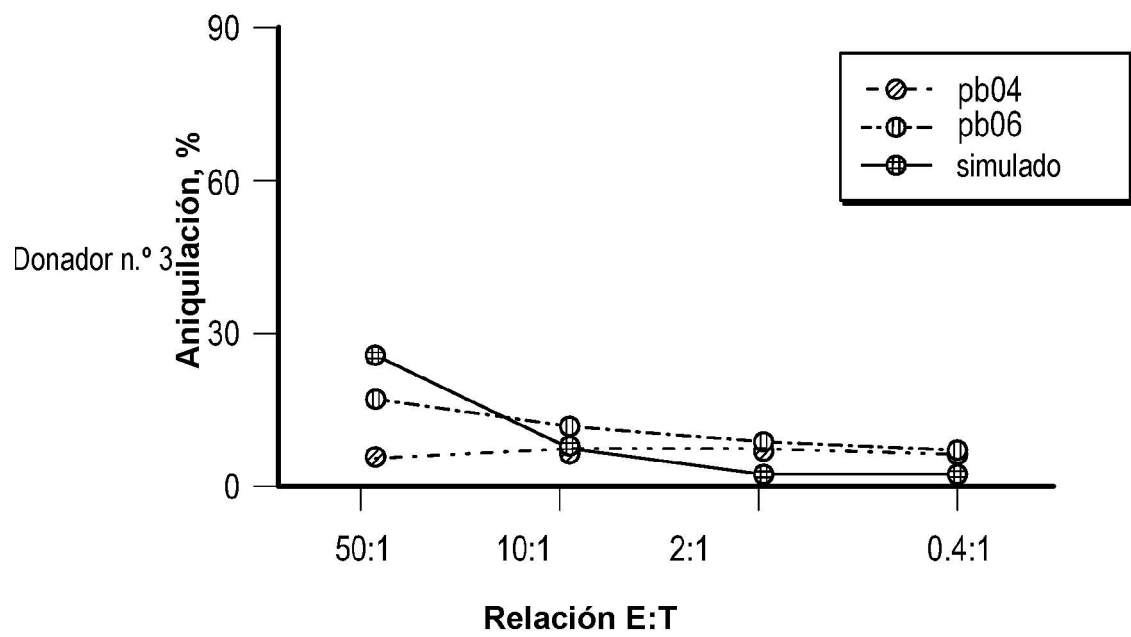


FIG. 27E

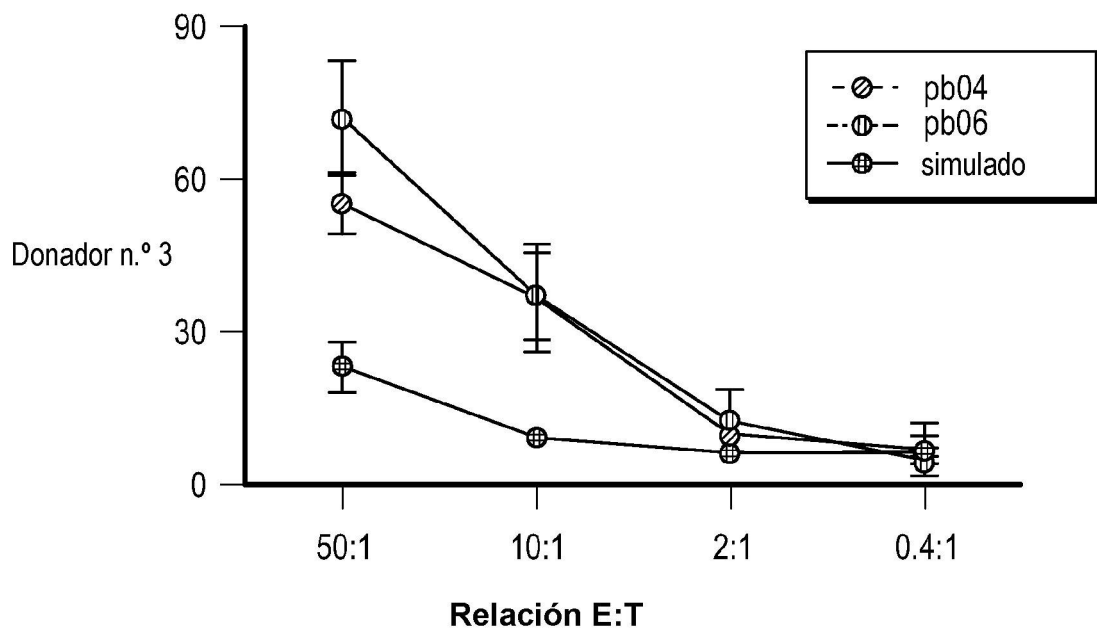
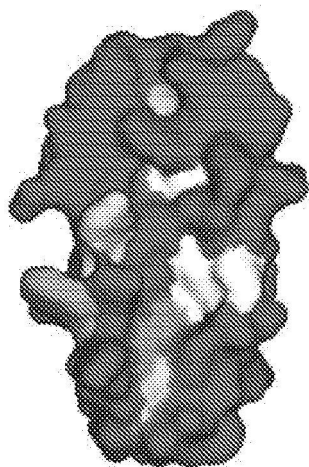
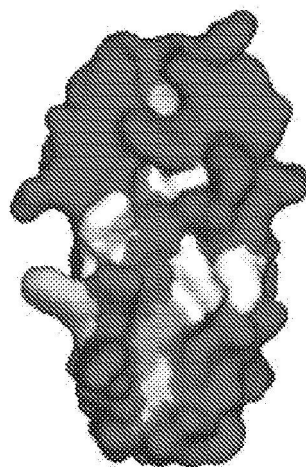


FIG. 27F



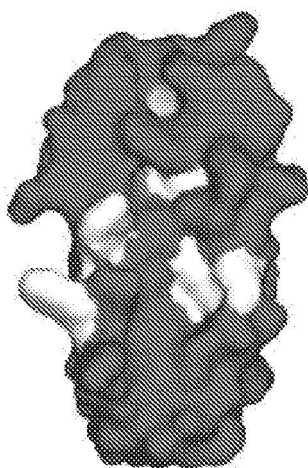
cg06 parental

FIG. 28A



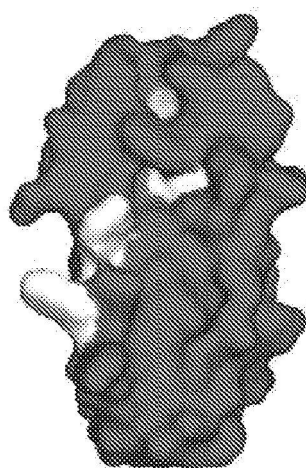
cg06
Un epítipo eliminado

FIG. 28B



cg06
Dos epítipos eliminados

FIG. 28C



cg06
Tres epítipos eliminados

FIG. 28D

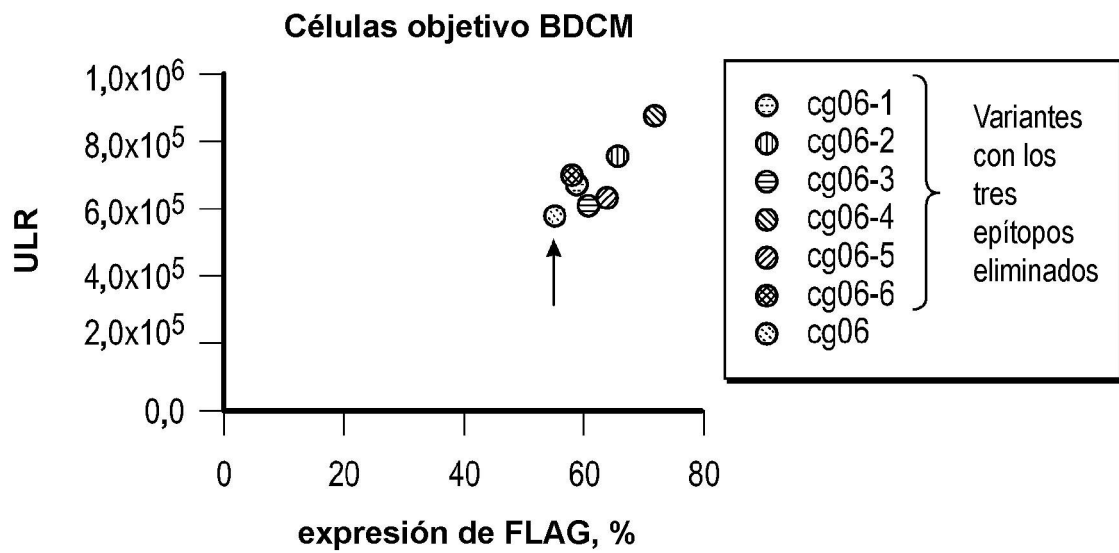


FIG. 29A

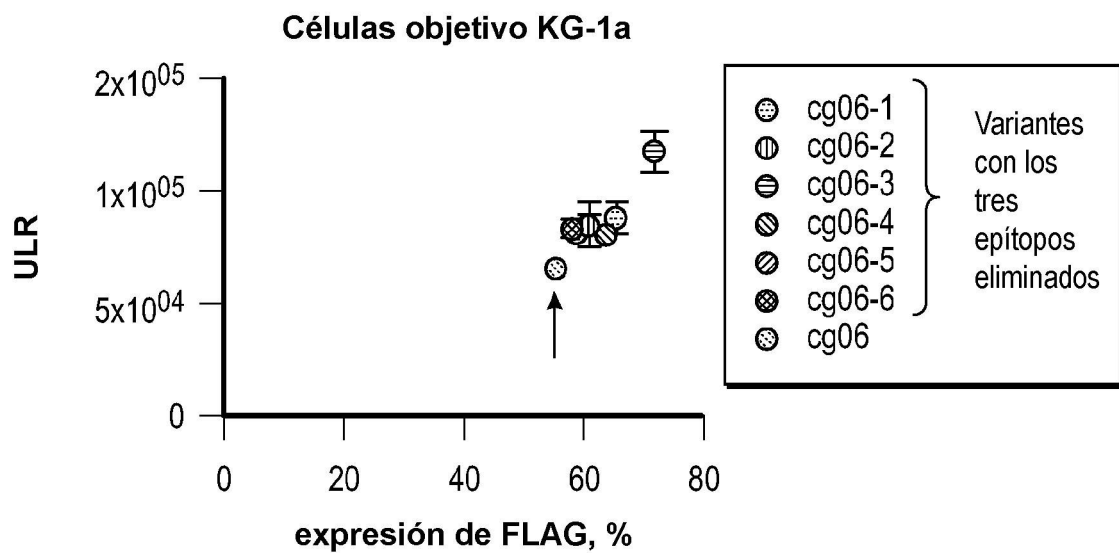


FIG. 29B

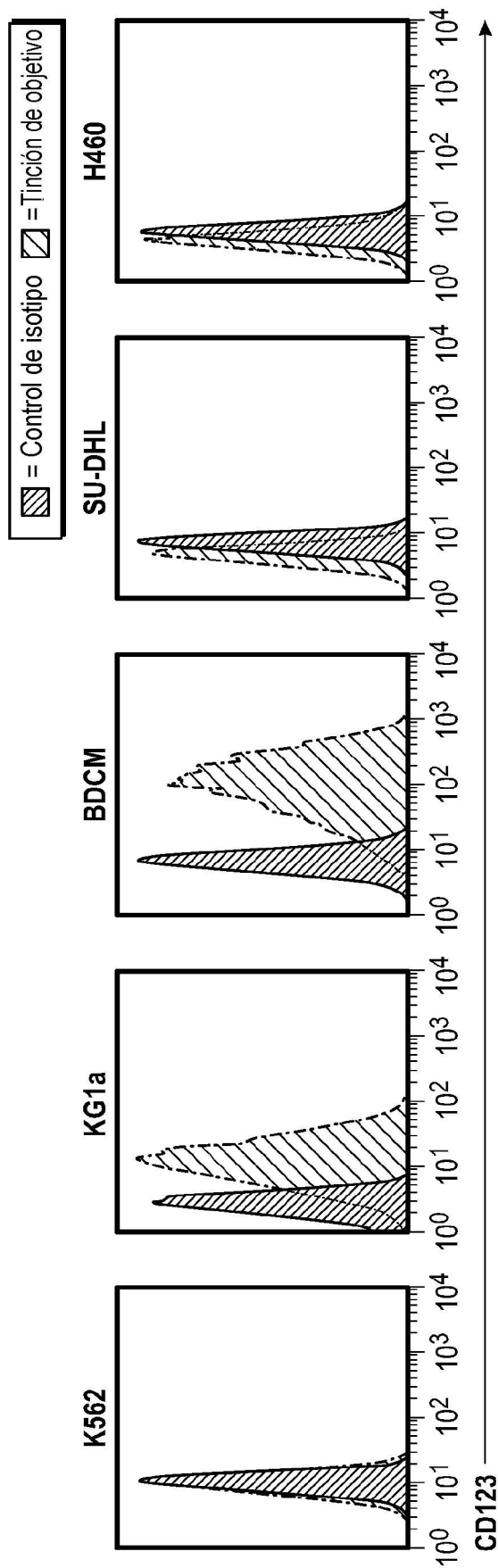


FIG. 30A

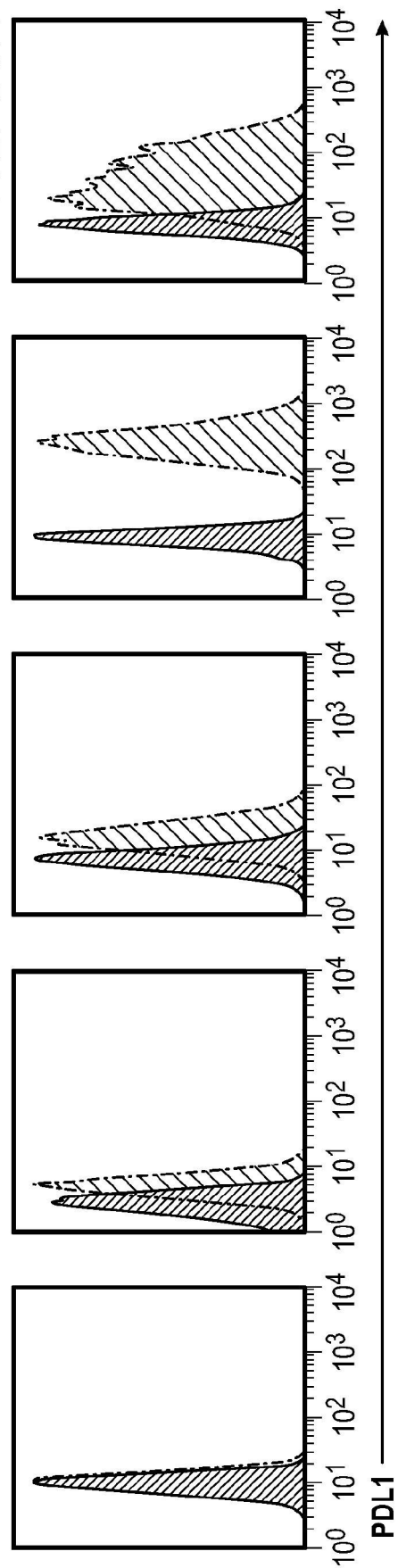


FIG. 30B

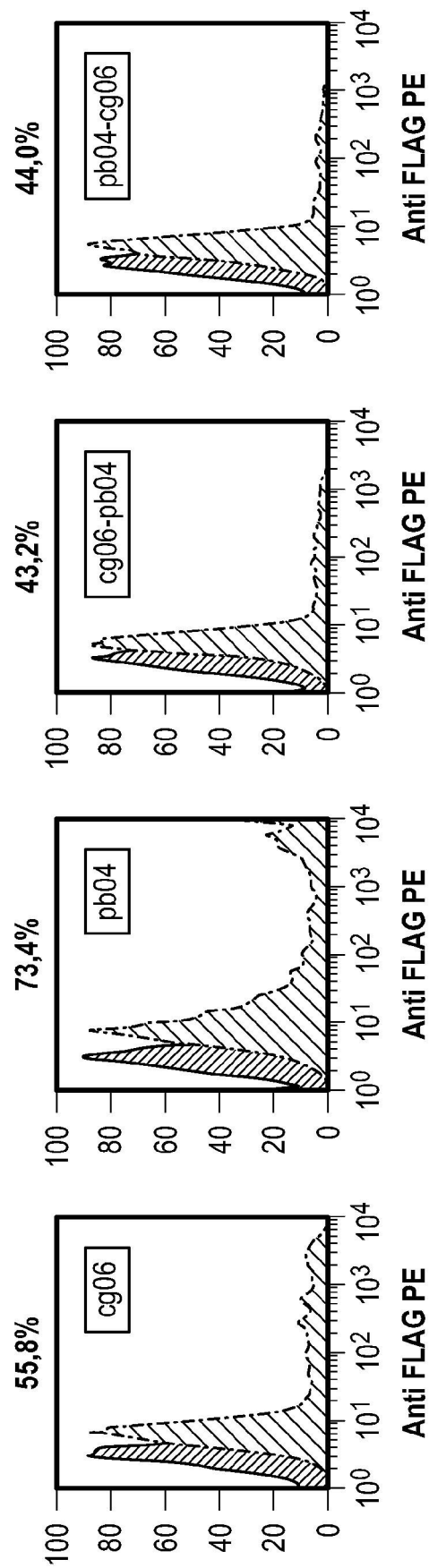
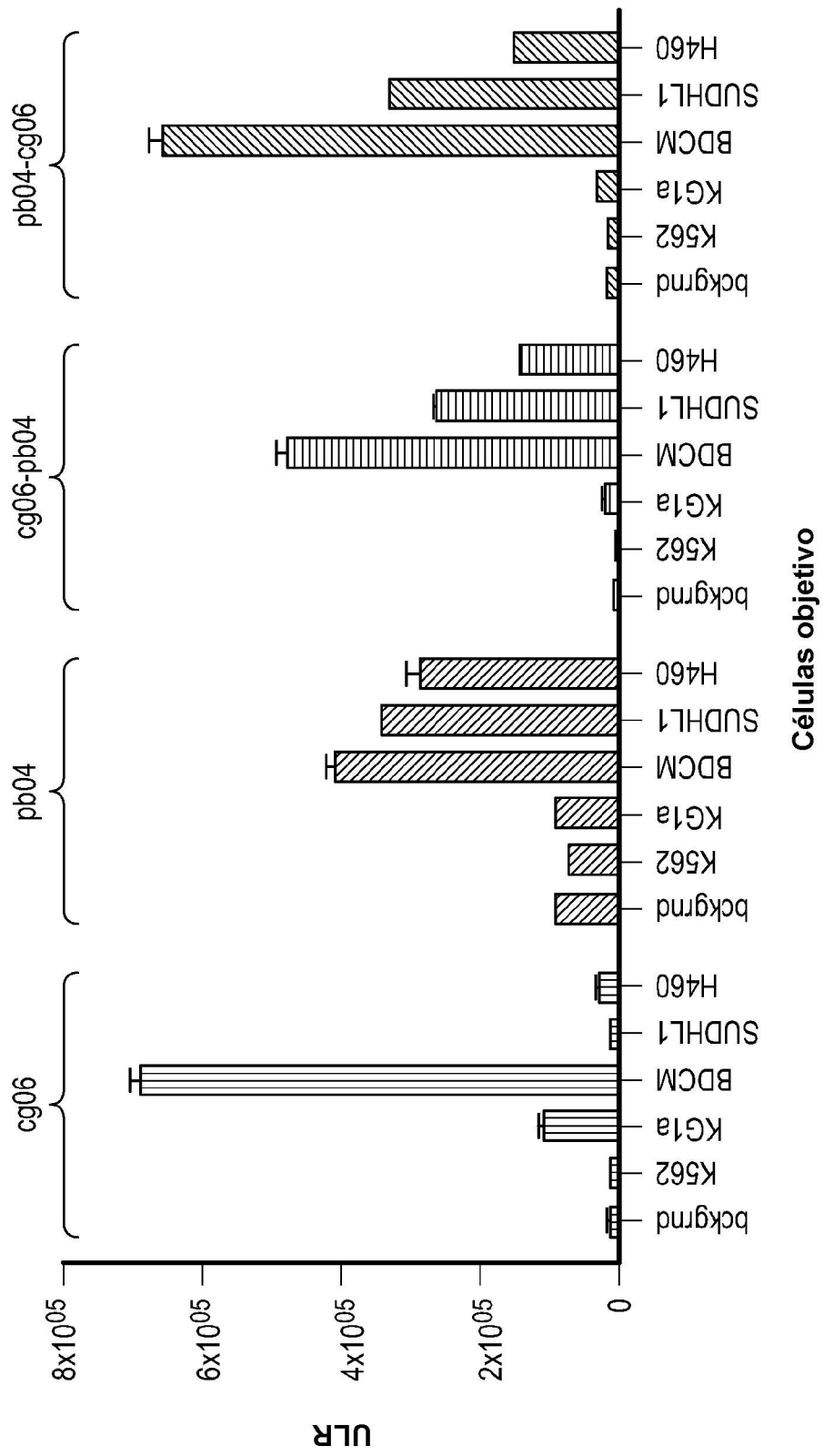


FIG. 31D

FIG. 31C

FIG. 31B

FIG. 31A



Células objetivo

FIG. 31E

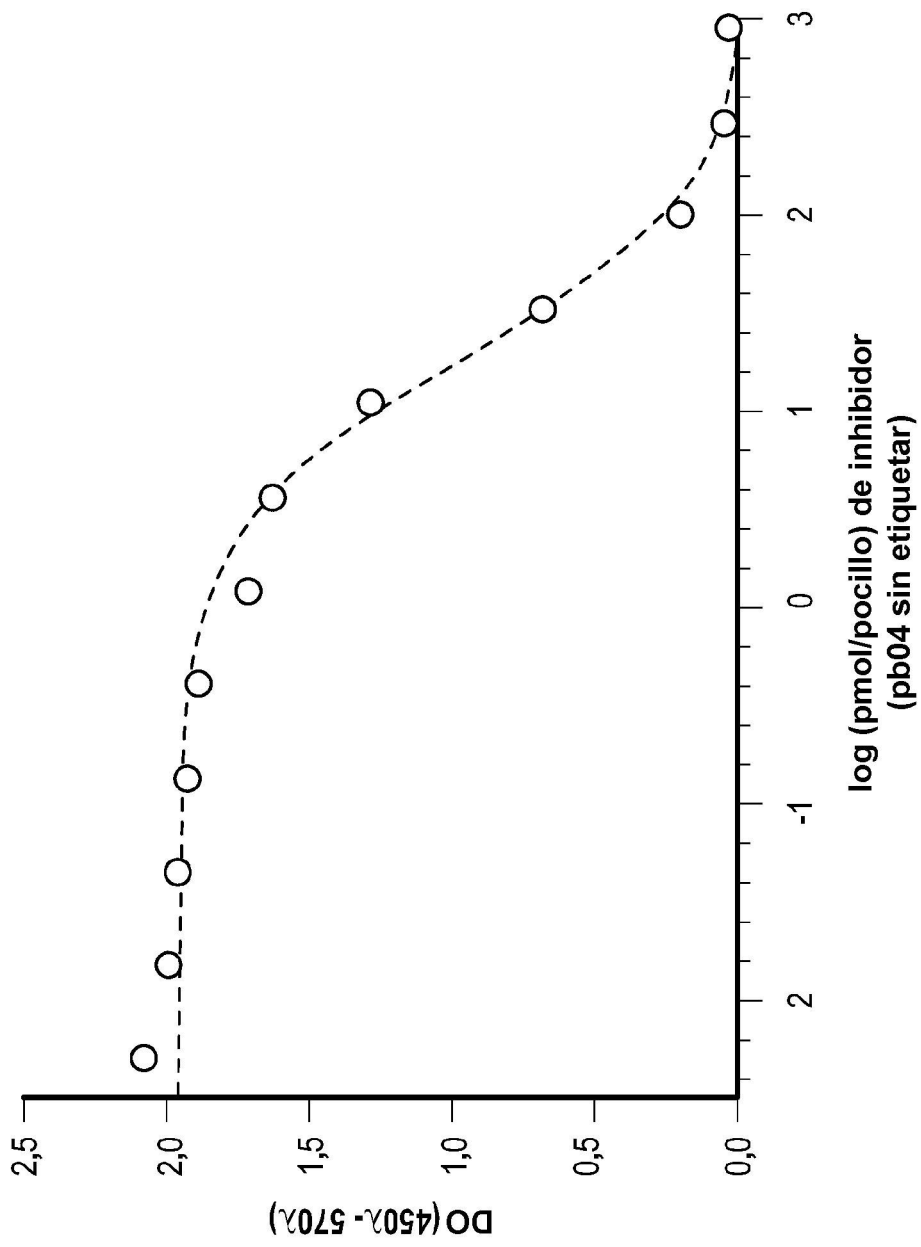


FIG. 32