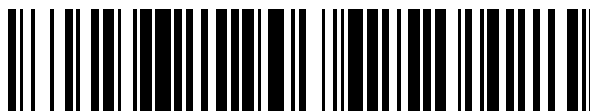


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 754**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07786810 .7**
96 Fecha de presentación: **22.06.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2035452**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.03.2009**

54 Título: **Receptores heterodiméricos solubles y usos de estos**

30 Prioridad:
22.06.2006 EP 06115901

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.07.2012

73 Titular/es:
**Novo Nordisk A/S
Novo Allé
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:
**SPEE, Petrus Johannes Louis;
PADKÆR, Søren Berg;
FRIEDRICHSEN, Birgitte Nissen y
NØRBY, Inga Sig Nielsen**

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

ES 2 385 754 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

Receptores heterodiméricos solubles y usos de estos

5 Campo de la invención

[0001] Esta invención se refiere a receptores heterodiméricos solubles para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, y a métodos de diseño y producción de tales receptores heterodiméricos solubles. Composiciones ejemplares de la invención comprenden fragmentos solubles de receptores heterodiméricos al igual que la porción Fc de las inmunoglobulinas.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Receptores solubles, tales como TNFR soluble (Enbrel®), han probado gran valor para aplicaciones terapéuticas. Receptores solubles pueden también ser usados para fines de diagnóstico, también, por ejemplo, para la selección de expresión de ligandos en tejidos enfermos, tales como tejidos tumorales en pacientes con cáncer.

20 [0003] La familia de receptores CD94/NKG2 está compuesta de elementos receptores heterodiméricos con activación o potencial inhibitorio. Estos receptores se expresan predominantemente en células NK y un subconjunto de células CD8+T, y han mostrado jugar un papel importante en las respuestas de regulación contra células tumorigénicas e infectadas. El ligando principal para el receptor CD94/NKG2 es HLA-E. La patente US n°. 6262244 a Houchins *et al.* describe la secuencia humana NKG2A (SEC ID n°: 1), y Chang *et al.* (*Eur J Immunol.* 1995,25:2433-7) informó de la secuencia CD94 humana (SEC ID n°: 2).

25 [0004] Versiones solubles de receptores CD94/NKG2 son de interés no solo como herramientas de investigación, sino también como agentes terapéuticos. Ambas aplicaciones diagnóstica y terapéutica, no obstante, requieren receptores solubles estables que se pueden producir eficazmente en un biosistema adecuado. Para muchos receptores heterodiméricos tales como, por ejemplo, CD94/NKG2, esto se ha mostrado, hasta el momento, difícil. Cuestiones potenciales son homo-dimerización de las subunidades individuales, y la estructura más compleja de receptores heterodiméricos los hace más difíciles para diseñar versiones solubles que son suficientemente estables.

35 [0005] Ciertas construcciones solubles CD94/NKG2A, basadas en la expresión de partes etiquetadas solubles de CD94 y proteínas NKG2A, se han propuesto en la literatura (Brooks *et al.*, *J Immunol* 1999;162:305-13; Ding *et al Scand. J. Immunol.* 1999,49:459-465; y Kaiser *et al. Journal of Immunology*, 2005, 174: 2878-2884). Versiones solubles de otros receptores multiméricos, algunos del cuales fusionados a partes Fc de inmunoglobulina, han sido descritos en, por ejemplo, WO9937772, WO200208272, y WO20023237, en relación a moléculas receptoras multiméricas IL-18; Wu *et al. (Protein Sci.* 1999;8:482-9), describe formas solubles del receptor IL-2; WO200222153, describe un receptor soluble IL-20; WO200212345, en relación a receptores de citocina solubles ZCY-TOR 11, WO2002101006, en relación a proteínas heteromultiméricas tales como receptores de células T, WO9533059, describe un receptor heterodimérico de gp130 y cadena beta receptora de oncostatina M, y US6238890, describe formas solubles de varias glicoproteínas. Versiones solubles de receptores de células T heterodiméricas o subunidades de estas también han sido descritas en, por ejemplo, Clements *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2002; 58:2131-4; Laugel *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2005;280:1882-1892; Kim *et al.*, *J Mol Biol.* 2000;302:899-916.

45 [0006] Además, las publicaciones de patentes US n° 20030195338 y 20040072256 describen varios tipos de proteínas de secuencia receptoras Fc enlazadas, la patente US n° 6,018,026 se refiere a proteínas de fusión dimerizadas; la patente US n° 6,033,041 se refiere a métodos para generar heteromultímeros quiméricos; las WO92/06204 y WO03012069 se refieren a, por ejemplo, técnicas para producir bibliotecas de receptores heterodiméricos; la publicación de patente US n° 20040138417 describe adhesinas heteromultiméricas. También, principios para promover formación de heteromultímeros se describen en la publicación de patente US n° 20030078385, y se revisa en Marvin y Zhu, *Acta Pharmacol Sino* 2005,26(6):649-658 (ver también Kontermann, *Acta Pharmacol. Sin.* 2005,26:1-9).

50 [0007] Además, Hayer *et al.*, *Nat. Immun.* 1998;16:78, Brooks *et al.*, *J Immunol.* 1999;162:305-313 y Vales-Gomez *et al.*, *Embo. J* 1999,18:4250-4260 todos revelan receptores diméricos solubles CD94/NKG2.

55 [0008] No obstante, permanece una necesidad de versiones solubles monocatenarias de receptores heterodiméricos tales como CD94/NKG2 para diagnóstico o usos terapéuticos, y métodos eficaces para producción de receptores heterodiméricos monocatenarios solubles estables. La presente invención se dirige a estas y otras necesidades en la técnica.

60 Resumen de la invención

[0009] La presente invención proporciona una proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 comprendiendo una parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 y una parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94. En algunos aspectos, las construcciones, comprenden además un polipéptido de inmunoglobulina

comprendiendo todo o parte de un dominio Fc o variante de este, una o dos porciones Fc de una molécula de inmunoglobulina.

5 [0010] En un aspecto ejemplar, la proteína de fusión monocatenaria soluble CD94/NKG2, comprende además un polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo todo o parte de un dominio Fc o variante de este. En otro aspecto ejemplar, la invención proporciona para una proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 donde el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se une al N-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2, y el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 se enlaza al polipéptido de inmunoglobulina.

10 [0011] En otro aspecto ejemplar, la invención proporciona una proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2, donde el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 se une al N-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, y el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se enlaza al polipéptido de inmunoglobulina.

15 [0012] En todavía otro aspecto ejemplar, la invención proporciona una proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2, donde la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 y parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se unen por un enlazador peptídico comprendiendo glicina y serina.

20 [0013] En un aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2, que es un receptor cD94/NKG2A CD94/NKG2B CD94/NKG2C CD94/NKG2E, o CD94/NKG2F. En todavía otro aspecto ejemplar, la invención proporciona una proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2, que es CD94/NKG2A. En todavía otro aspecto ejemplar, la invención proporciona una proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2A, comprendiendo residuos los 99-233 de SEC ID n°: 1.

25 [0014] En todavía un aspecto ejemplar, la invención proporciona una proteína de fusión monocatenaria soluble CD94/NKG2, que es CD94/NKG2C. En un aspecto más ilustrativo, la invención proporciona una proteína de fusión monocatenaria soluble CD94/NKG2C, comprendiendo los residuos 96-231 de la SEC ID n°: 3.

30 [0015] En todavía un aspecto más ilustrativo, la invención proporciona una proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 comprendiendo los residuos 35-179 de la SEC ID n°: 2. En un aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión receptora soluble CD94/NKG2A comprendiendo la secuencia de cualquiera de las SEC ID n°: 37-39.

35 [0016] En todavía otro aspecto ejemplar, la invención proporciona un dímero de proteína de fusión receptor monocatenario soluble CD94/NKG2 según cualquiera de los aspectos ejemplares precedentes.

40 [0017] En un aspecto más ilustrativo, la invención proporciona un método para producir una proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2, comprendiendo cultivo de una célula comprendiendo un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 de cualquiera de los aspectos ejemplares precedentes bajo condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2. En todavía otro aspecto ejemplar, la invención proporciona una composición farmacéutica comprendiendo una cantidad eficaz de la proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 de cualquiera de los aspectos ejemplares precedentes y un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente.

45 [0018] La invención también proporciona varios métodos de fabricación tales construcciones solubles, al igual que varios usos de las construcciones solubles según la invención. Un uso ejemplar está en la detección del ligando natural (p. ej., HLA-E) en una muestra biológica.

50 [0019] Estos y otros aspectos son descritos con más detalle a continuación y en los dibujos.

Descripción de los dibujos

[0020]

55 Figura 1: proteína de fusión Fc soluble CD94/NKG2A.

Figura 2: proteína de fusión Fc soluble CD94/NKG2A comprendiendo heterodimerización Fc1-Fc2 forzada. Construcciones con mutaciones en los residuos cargados del dominio Fc permite al heterodímero ser formado de cadenas NKG2A-Fc y CD94-Fc independientes.

60 Figuras 3A y B: (A) proteína de fusión monocatenaria ejemplar Fc-NKG2A-CD94 con un enlazador GGSGG del C-terminal de NKG2A al N-terminal de CD94. (B) Cadena ejemplar única Fc-CD94-NKG2A con un enlazador GGSGG (identidad SEC NO:6) del C-terminal de CD94 al N-terminal de NKG2A. Las construcciones permiten el pliegue del CD94/NKG2A en una conformación activa y permiten dimerización de la parte Fc.

Figura 4. Modelo *in silico* de CD94/NKG2A complejo con HLA-E. El modelo muestra que N y C terminales están muy cerca, permitiendo diferentes tipos de construcciones.

65 Figura 5: Etiquetado de la parte constante de la cadena pesada para los alotipos GM (SEC ID n°: 8) y KM (SEC ID n°: 9).

Figura 6: Etiquetado de las regiones constantes Kappa (SEC ID nº: 10) y Lambda (SEC ID nº: 11).

Figura 7A-7C: Alineamiento de secuencias de inmunoglobulina humana, de ratón y de rata, referido por el respectivo nombre de introducción UNIPROT. (GC1_RAT: SEC ID NO:12; GC3_MOUSE: SEC ID NO:13; GCAA_MOUSE: SEC ID NO:14; GCAB_MOUSE: SEC ID NO:15; GCA_RAT: SEC ID NO:16; GCB_MOUSE: SEC ID NO:17; GCB_RAT: SEC ID NO:18; GCC_RAT: SEC ID NO:19; IGHG1-HUMAN: SEC ID NO:20; IGHG1_MOUSE: SEC ID NO:21; IGHG2_HUMAN: SEC ID NO:22; IGHG3_HUMAN: SEC ID NO:23; IGHG4_HUMAN: SEC ID NO:24).

Figura 8: Alineamiento de murina de tipo salvaje y de variantes de secuencias de inmunoglobulina. mFc: identidad SEC NO:25 mFc-IGHG1: residuos 98 a 324 de identidad SEC NO:21 mFc dm NKG2A: identidad SEC NO:26 mFc dm CD94: SEC ID NO:27 mFc sm NKG2A: SEC ID NO:28 y mFc sm CD94: SEC ID NO:29.

Figura 9: Construcción de plásmido pcDNA3.1 (+)-mFc-hCD94 (ejemplo 4).

Figura 10: Construcción de plásmido pcDNA3.1/Hygro(+)-mFc-hNKG2A (ejemplo 4).

Figura 11: Construcción de plásmido pcDNA3.1/Hygro(+)-mFc-hNKG2A-GGS-GGS-hCD94 (ejemplo 6).

Figuras 12A-C: Análisis de transferencia Western de (A) hCD94-mFc/hNKG2A-mFc bajo condiciones no reducidas, (B) hCD94- mFc/hNKG2A-mFc bajo condiciones de reducción, y (C) mFc-NKG2A-CD94 de cadena simple expresado en HEK293 bajo reducción y condiciones no reducidas (ejemplo 7).

Figuras 13A y B: Análisis de transferencia SDS-PAGE/Western de construcciones después de purificación de proteína A usando (A) anticuerpos anti-CD94 (HP- 3D9) (Cy3-marcados), o (B) anticuerpos anti-NKG2A (Z199) (Cy5-marcados). Columna 1: marcador PM (no visto); Columna 2: pBF5 CD94-mFc; Columna 3: pBF17 CD94-2xGGS-NKG2A-mFc; Columna 4: pBF6 NKG2A-mFc; Columna 5: pBF19 CD94- T249Y mFc y pBF20 NKG2A-mFc Y290T; Columna 6: pBF5 CD94-mFc y pBF6 NKG2A-mFc; Columna 7: pBF21 CD94-, e239K mFc K292D y pBF22 NKG2A-mFc, d282K K332E (ejemplo 8).

Figuras 14A y B: transferencia de SDS-PAGE/Western de fracciones diferentes de purificación de CD-94-2xGGS-NKG2A-mFc en la columna de proteína A usando (A) anticuerpo anti-CD94 (HP-3D9) (Cy3-marcado B) y (B) anticuerpos anti-NKG2A (Z199) (Cy5- marcados). Columna 1: marcador PM; Columna 2: aplicación; Columna 3: flujo circulante; Columna 4: fracción A10; Columna 5: fracción A11; Columna 6: fracción A12; Columna 7: fracción B1; Columna 8: fracción B2; Columna 9: fracción B3; Columna 10: fracción B4; Columna 11: fracción B5; Columna 12: fracción B6.

Figura 15: Construcción de plásmido Trx-hexaHis pET32a hNKG2A (pISNN415) (ejemplo 9).

Figura 16: Análisis de expresión Trx-hexaHis-NKG2A en *E. coli* (ejemplo 10; p = fracción de granulado; s = fracción soluble).

Figura 17: Construcción de plásmido HexaHis-GST XPNNB pET15b hCD94 (pISNN427) (ejemplo 11).

Figura 18: Análisis de expresión hexaHis-GST-CD94 en *E. coli* (ejemplo 12; p = fracción de granulado; s = fracción soluble).

Figuras 19A y B: (A) Construcción NKG2A-2xGGS; (B) Construcción NKG2A-2xGGS-CDF94 (ejemplo 13).

Figura 20: Dímero monocatenario de construcción de plásmido NKG2A-2xGGS-CD94 GST XPNNB pET15b (ejemplo 13).

Figura 21: Dímero monocatenario de construcción NKG2A-2xGGS-CD94.

Figura 22: Construcción de plásmido CD94-2xGGS-NKG2A GST XPNNB pET15b (ejemplo 13).

Figura 23: Expresión 6His-GST-NKG2A-2xGGS-CD94 y Trx-6His-NKG2A-2xGGS-CD94 en *E. coli* (ejemplo 14; p = fracción de granulado; s = fracción soluble).

Figura 24: Unión de construcción monocatenaria NKG2A/CD94 (mFc-GS-NKG2A-GSSGGS-RSS-CD94) a anticuerpos anti-NKG2A (Z199, gris claro) y anti-CD94 (HP-3D9, gris oscuro) (ejemplo 19).

Figura 25: Alineamiento de partes extracelulares de proteínas NKG2.

Numeración según la secuencia completa NKG2A (SEC ID nº: 1 (NKG2A), 3 (NKG2C), 4 (NKG2E), 5 (NKG2F), y 70 (NKG2B) para secuencias en toda su longitud.

Figura 26: Sensogramas superpuestos que muestran humZ270; humZ199, anti-NKG2C-PE y humON72 unión chip scCD94/NKG2A (línea sólida negra), chip scCD94/NKG2C (línea gris) y chip NKG2D-Fc (línea discontinua). Anticuerpos a 10 µg/ml fueron inyectados durante un minuto a una velocidad de flujo de 10 µl/min.

Definiciones

[0021] El término "receptor" denota una proteína asociada a célula que se une a una molécula bioactiva (es decir, un ligando) y media el efecto del ligando en la célula. Receptores unidos a membrana se caracterizan por el hecho de que una estructura multi-dominio comprendiendo un dominio de unión de ligandos extracelular y un dominio efector intracelular que está implicado típicamente en la transducción de señal. Unión de ligando a receptor produce un cambio conformacional en el receptor que causa una interacción entre el dominio del efector y otra molécula(s) en la célula. Esta interacción sucesivamente conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Eventos metabólicos que se unen a interacciones receptor-ligando incluyen transcripción de gen, fosforilación, defosforilación, aumentos en la producción cíclica AMP, movilización de calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. Un receptor ejemplar descrito aquí es el receptor CD94/NKG2A.

[0022] Por "heteromultimérico" o "multimérico" se entiende comprendiendo dos o más subunidades diferentes. Un receptor "heterodimérico" contiene dos subunidades diferentes, aquí denominadas "S1" (subunidad 1) y "S2" (subunidad 2).

[0023] Por receptor multimérico "soluble" se entiende aquí un receptor multimérico, cada uno de cuyas subunidades comprende parte o todo un dominio extracelular de un receptor, pero carece de partes o la totalidad de cualquier

dominio de transmembrana, y carece de la totalidad de cualquier dominio intracelular. En general, un receptor soluble de la invención es soluble en una solución acuosa. No obstante, bajo ciertas condiciones, el receptor puede estar en forma de un cuerpo de inclusión, que es fácilmente solubilizado por procedimientos estándar. Una "porción soluble de la subunidad 1" puede aquí ser denominada "sS1" mientras que "una porción soluble de la subunidad 2" puede ser denominada "sS2".

[0024] Una proteína "híbrida" es una proteína comprendiendo dos segmentos de polipéptido unidos vía al menos una conexión distinta de un enlace peptídico (p. ej., por acoplamiento químico o una interacción de afinidad tal como vía, por ejemplo, biotina/avidina).

[0025] Una proteína de "fusión" es una proteína comprendiendo dos segmentos de polipéptido unido por un enlace peptídico, producido, por ejemplo, por procesos recombinantes.

[0026] El término "NKG2" incluye polipéptidos en toda su longitud o parcialmente de cualquier y todos los elementos de la familia NKG2, incluyendo, pero no limitado a, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, y NKG2F, también un ortólogos humano y no humano de estos elementos y variantes de estos. Típicamente, la secuencia de aminoácidos de una variante de un polipéptido NKG2 es altamente idéntico o similar a la secuencia de aminoácidos del polipéptido NKG2 de tipo salvaje correspondiente (p. ej., al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico).

[0027] El término "NKG2A" incluye polipéptidos NKG2A en toda su longitud o parcialmente de ambos ortólogos humano y no humano, al igual que variantes de estos. Típicamente, la secuencia de aminoácidos de una variante de un polipéptido NKG2A es altamente idéntica o similar a la secuencia de aminoácido de un polipéptido NKG2A de tipo salvaje (p. ej., al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico).

[0028] El término "NKG2C" incluye polipéptidos NKG2A en toda su longitud o parcialmente de ambos ortólogos humano y no humano, al igual que variantes de estos. Típicamente, la secuencia de aminoácidos de una variante de un polipéptido NKG2A es altamente idéntica o similar a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido NKG2A de tipo salvaje (p. ej., al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico).

[0029] El término "CD94" incluye polipéptidos CD94 en toda su longitud o parcialmente de ambos ortólogos humano y no humano, al igual que variantes de estos. Típicamente, la secuencia de aminoácidos de una variante de un polipéptido CD94 es altamente idéntica o similar a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido CD94 de tipo salvaje (p. ej., al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico).

[0030] El término "ortólogo" denota un polipéptido o proteína obtenido de una especie que es el duplicado funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de especialización.

[0031] Un "dominio Fc" aquí generalmente se refiere a un polipéptido comprendiendo todo o parte del dominio Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Este incluye, pero no está limitado a, polipéptidos comprendiendo los dominios enteros CH1, bisagra, CH2, y/o CH3 al igual que fragmentos de tales péptidos comprendiendo solo, por ejemplo, el dominio de bisagra, CH2, y CH3. El dominio Fc se puede derivar de una inmunoglobulina de cualquier especie y/o cualquier subtipo, incluyendo, pero no limitado a, un anticuerpo humano IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM. Secuencias Fc ejemplares se proveen aquí, por ejemplo, en las Figuras 5-7.

[0032] Como se utiliza en este caso, una "variante" de polipéptido de un progenitor o polipéptido de tipo salvaje contiene una o más sustituciones de aminoácido, deleciones y/o adiciones en comparación con el progenitor o tipo salvaje. Típicamente, tales variantes tienen una identidad de secuencia al progenitor o secuencia de tipo salvaje de al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, 98%, o al menos aproximadamente 99%, y han conservado o mejorado propiedades en comparación con el progenitor o polipéptido de tipo salvaje. Algunos cambios pueden no afectar significativamente al pliegue o actividad de la proteína o polipéptido; sustituciones de aminoácido conservadoras, como se conocen bien en la técnica, cambian un aminoácido a uno con una cadena lateral con propiedades fisicoquímicas similares (aminoácido básico: arginina, lisina e histidina; aminoácidos ácidos: ácido glutámico y ácido aspártico; aminoácidos polares: glutamina y asparagina; aminoácidos hidrofóbicos: leucina, isoleucina, valina; aminoácidos aromáticos: fenilalanina, triptófano, tirosina; aminoácidos pequeños: glicina, alanina, serina, treonina, metionina), deleciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y extensiones amino- o carboxi- terminales pequeñas, tales como un amino-terminal residuo de metionina, un pequeño péptido de enlace de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una pequeña extensión que facilita purificación (una marca de afinidad), tal como un tracto de polihistidina, proteína A (Nilsson *et al.*, *EMBO* 1985;14:1075 *et seq.*; Nilsson *et al.*, *Methods Enzymol.* 1991; 198:3 *et seq.*), glutationa S-transferasa (Smith and Johnson, *Gene* 1988; 67:31 *et seq.*), u otro dominio antigénico:epitope o de unión. Ver, en general Ford *et al.*,

Protein Expression and Purification 1991;2:95-107. Identificativos de afinidad de codificación ADN están disponibles de proveedores comerciales.

5 [0033] Diferencias de secuencia o "identidad", en el contexto de secuencias de aminoácidos, se pueden determinar por cualquier técnica adecuada, tal como (y como una selección adecuada en el contexto de esta invención) utilizando un análisis de alineamiento Needleman-Wunsch (ver Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* (1970) 48:443-453), tal como está provisto vía análisis con ALIGN 2.0 usando el matriz de marcado BLOSUM50 con una penalización de espacio inicial de -12 y una penalización de extensión de -2 (ver Myers and Miller, *CABIOS* (1989) 4:11-17 para discusión de las técnicas de alineamiento globales incorporadas en el ALIGN programa). Un copia del programa ALIGN 2.0 está disponible, por ejemplo, a través de San Diego Supercomputer (SDSC) Biology Workbench. Debido a que el alineamiento de Needleman-Wunsch proporciona una medición total o global de identidad entre dos secuencias, debe reconocerse que secuencias objetivo que pueden ser partes o subsecuencias de secuencias peptídicas más grandes se pueden utilizar en cierto modo análogo para completar secuencias o, alternativamente, valores de alineamiento locales pueden utilizarse para valorar relaciones entre subsecuencias, como determinado por, por ejemplo, un alineamiento de Smith-Waterman (*J. Mol. Biol.* (1981) 147:195-197), que se puede obtener a través de programas disponibles (otros métodos de alineamiento locales que se pueden adecuar para identidad de análisis incluyen programas que aplican algoritmos de alineamiento heurísticos locales tales como los programas FastA y BLAST). Además, métodos relacionados para evaluar identidad se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 03/048185. El algoritmo de Gotoh, que busca perfeccionar el algoritmo de Needleman-Wunsch, alternativamente se puede usar para alineamientos de secuencia globales. Ver, por ejemplo, Gotoh, *J. Mol. Biol.* 162:705-708 (1982).

Descripción de la invención

25 [0034] La presente invención proporciona para complejos de receptores monocatenarios solubles a partir de receptores heterodiméricos, todos comprenden una parte soluble de cada una de las dos subunidades de un receptor heterodimérico, y, en algunos aspectos, al menos una porción Fc de una molécula de inmunoglobulina.

30 [0035] También se describen receptores donde cada parte soluble se asocia o se une de manera covalente a una porción Fc de una inmunoglobulina, y el complejo receptor soluble final se forma asociando o uniendo de manera covalente el híbrido o proteína de fusión comprendiendo la parte soluble de la primera subunidad (sS1-Fc) al híbrido o proteína de fusión comprendiendo la parte soluble de la segunda subunidad (sS2-Fc). Conexión de los distintos segmentos puede ser obtenida vía, por ejemplo, unión covalente tal como por reticulación química, enlaces peptídicos, puentes disulfuro, etc., o interacciones de afinidad tales como por avidina-biotina o tecnología de cremallera de leucina.

35 [0036] También se describen receptores donde la molécula Fc de cada proteína de fusión comprende mutaciones específicas diseñadas para producir heterodimerización forzada entre las proteínas de fusión diferentes, dando como resultado un complejo receptor soluble donde proteína de fusión sS1-Fc1 se funde con sS2-Fc2.Fc2.

40 [0037] El complejo receptor soluble de la presente invención es un complejo de proteína de fusión de receptor-Fc monocatenario soluble, comprendiendo la parte soluble de la primera subunidad (sS1) unida a la parte soluble de la segunda subunidad (sS2). En una forma de realización particular, el C-terminal de uno de sS1 y sS2 es posteriormente unido a una porción Fc. Conexión de los distintos segmentos se obtiene vía unión covalente tal como por enlaces peptídicos. La proteína receptora monocatenaria es una proteína de fusión, es decir, todos los enlaces entre segmentos diferentes en la proteína son vía enlaces peptídicos o vía unión péptido-péptido directa.

45 [0038] En todavía otro aspecto, dos unidades de la proteína de fusión Fc monocatenaria anteriormente descrita son juntadas o enlazadas, formando así esencialmente un homodímero de un receptor heterodimérico. En una forma de realización ejemplar, el receptor heterodimérico es un receptor CD94/NKG2, y las dos proteínas de fusión Fc monocatenarias están unidas vía un enlace bisulfuro entre residuos de cisteína de origen natural en los segmentos solubles de las subunidades NKG2 y CD94.

50 [0039] Los complejos de receptor solubles de receptores heterodiméricos según la invención pueden ser más estables y así se pueden almacenar más tiempo. Además, complejos de receptor estables solubles de receptores heterodiméricos se adecuan en aplicaciones donde una vida media más larga es requerida, por ejemplo, para inmunizaciones y aplicaciones terapéuticas.

55 [0040] Como se describe en los ejemplos, los N y C-terminales de NKG2A y CD94 fueron encontrados estar encerrados en un modelo CD94/NKG2A *in silico*. Esto confirmó la idoneidad de receptores solubles CD94/NKG2 heterodiméricos según la invención, ya que un C-terminal de una primera subunidad puede después unirse al N-terminal de la segunda subunidad por un enlazador de péptido corto, y debido a homología secuencial alta en las partes solubles de proteínas NKG2 (ver Fig. 25). Así, en formas de realización específicas y separadas, el receptor heterodimérico es uno donde el N-terminal de la primera subunidad está cerca del C-terminal de la segunda subunidad están cerca, o uno donde el N-terminal de la primera subunidad está cerca del C-terminal de la segunda subunidad y el C-terminal de la primera subunidad está cerca del N-terminal de la segunda subunidad. Por ejemplo, en una forma de realización, "cerca" como se utiliza en este caso significa que la distancia entre los alfa-carbonos respectivos está dentro de aproximadamente 4 a aproximadamente 40, aproximadamente 4 a aproximadamente 30, aproximadamente 4 a aproximadamente 20, o

aproximadamente 4 a aproximadamente 15, Ångstrom uno del otro. En otra forma de realización, "cerca" significa dentro de aproximadamente 13 a aproximadamente 15 Angstrom el uno del otro.

[0041] Las siguientes construcciones CD94/NKG2 solubles son descritas:

- 5 1) CD94-Fc/NKG2-Fc: una proteína de fusión Fc estable o proteína híbrida conjugada comprendiendo dominios extracelulares de CD94 y una proteína NKG2 que es ambos conjugada o fundida con murina Fc. La proteína se puede producir y segregar de células mamíferas y purificar por una cromatografía de afinidad monopaso. Este complejo receptor soluble se puede ilustrar en la Figura 1, donde el puente disulfuro ilustrado es uno que ocurre naturalmente en el receptor CD94/NKG2A.
- 10 2) CD94-Fc1 /NKG2-Fc2: una proteína de fusión Fc estable o proteína conjugada comprendiendo dominios extracelulares de CD94 y una proteína NKG2, cada una de los cuales se funde a un dominio Fc de murina mutada diferentemente. Las mutaciones en el dominio Fc fundido o conjugado al segmento soluble CD94 promueve dimerización con el dominio Fc mutado fundido o conjugado al segmento soluble NKG2, y viceversa, evitando así homodimerización CD94- o NKG2. La proteína se puede producir y segregar de células mamíferas y purificar por una cromatografía de afinidad monopaso. Este complejo receptor soluble se puede ilustrar en la Figura 2, donde el puente disulfuro ilustrado es uno que ocurre naturalmente en el receptor CD94/NKG2A.
- 15 3) Monocatenario CD94/NKG2-Fc: Una proteína de fusión Fc estable monocatenaria comprendiendo dominios extracelulares de CD94 y una proteína NKG2 que son, por ejemplo, unidas por un separador de serina-glicina, y/o fundidas o conjugados a una secuencia Fc. La proteína se puede producir y segregar a partir de células mamíferas y purificar por una cromatografía de afinidad monopaso. En una forma de realización ejemplar, una proteína de fusión Fc receptora soluble se puede ilustrar en la Figura 3, donde unión entre los distintos segmentos en la proteína de fusión se obtiene vía enlaces de glicina-serina.
- 20

[0042] Como se describe en los ejemplos 18 y 19, receptores solubles CD94/NKG2A unidos a HLA-E soluble, al igual que Mab's específico para CD94 (HP-3D9) y NKG2A (Z199), indicando que ellos fueron debidamente plegados. Los receptores solubles CD94/NKG2A evaluados parecieron estables, ya que ellos, con pocas excepciones, fueron capaces de unir tetrámeros solubles HLA-E, HP3D9 (Anti-CD94) y anti-NKG2A (Z199) después de almacenamiento a 4°C o -20°C en PBS durante, en algunos casos, diferentes semanas. Además, como se describe en los ejemplos 20 y 21, unos receptores solubles CD94/NKG2C fueron preparados y fueron encontrados capaces de unirse a un anticuerpo anti-NKG2C-específico.

[0043] Las construcciones receptoras monocatenarias de la invención comprenden partes solubles de cada subunidad monomérica y al menos un polipéptido comprendiendo todo o parte de un dominio de constante de cadena pesada de inmunoglobulina (es decir, un dominio Fc).

[0044] Receptores heterodiméricos típicos sobre los que los presentes principios puede ser aplicados incluyen, pero de forma no limitativa, el receptor cD94/NKG2A, CD94/NKG2B, CD94/NKG2C, CD94/NKG2E y CD94/NKG2F. La familia NKG2 de receptores tienen una alta homología secuencial, como se muestra en la Figura 25. Partes adecuadas solubles de las subunidades monoméricas de estos receptores para uso en las construcciones de la presente invención se pueden conocer de la literatura científica, o deducir usando análisis informatizado estándar de algoritmos basados en ordenador públicamente disponibles de secuencia de aminoácidos tal como TMHMM (disponible en la dirección de la world-wide web (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)).

[0045] CD94 (Uniprot accesión nº Q13241) comprende 179 aminoácidos en 3 dominios, una región citoplasmática comprendiendo residuos 1-10, una región de transmembrana comprendiendo residuos 11-31 y una región extracelular comprendiendo residuos 32-179, de la siguiente secuencia:

MAVFKTTLWRLISGTLGIICLSLMATLGILLKNSFTKLSIEPAFTPGPNIELQKDSGCC
 SCQEKWVGYRCNCYFISSEQKTWNESRHLCASQKSSLLQLQNTDELDFMSSSQQFYWIGL
 SYSEEHTAWLWENGSALESQYLFPSEFETFNKNCIAYNPNGNALDESCEDKNRYICKQQLI
 (SEQ ID NO:2).

[0046] Un receptor ejemplar heterodimérico es el receptor CD94/NKG2A. NKG2A (Uniprot accesión nº P26715) comprende 233 aminoácidos en 3 dominios, con un dominio citoplasmático comprendiendo residuos 1-70, una región de transmembrana comprendiendo residuos 71-93 y una región extracelular comprendiendo residuos 94-233, de la siguiente secuencia:

MDNQGVVYSDLNLPNPKRQQRKPKGNKSSILATEQEITYAELNLQKASQDFQGN
 DKTYHCKDLPSAPEKLIVGILGIICLILMASVVTIVVIPSTLIQRHNNSSLNTRTQKARHCGHCP
 EEWITYNSCYIYGKERRTWEESLLACTSKNSSLLSIDNEEEMKFLSIISPSSWIGVFRNSSH
 HPWVTMNGLAFKHEIKDSDNAELNCAVLQVNRLKSAQCGSSIIYHCKHKL (SEQ ID NO:1).

5 [0047] Otro receptor ejemplar heterodimérico es el receptor CD94/NKG2C. La secuencia NKG2C (SEC ID n°: 3) comprende 231 aminoácidos en disposición similar como se describe para NKG2A. La Figura 25 muestra un alineamiento entre las partes extracelulares de hNKG2A y hNKG2C.

10 [0048] Como se ha descrito anteriormente, otros receptores NKG2 pueden también ser aplicados para construir receptores monocatenarios según la invención. En tales construcciones, una unidad de monómero comprende un segmento soluble de una secuencia CD94, y un segmento soluble de una secuencia NKG2 de, por ejemplo, NKG2B (SEC ID n°: 70), NKG2E (SEC ID n°: 4), o NKG2F (SEC ID n°: 5) humano.

15 [0049] Diferentes ortólogos no humanos a CD94 y NKG2A se conoce que también pueden ser usados en la preparación de receptores solubles CD94/NKG2A. Ortólogos no limitativos de humano NKG2A incluyen aquellos teniendo Uniprot números de acceso Q95M15 (UNIPROT-ID:NKG2A_PANTR (Chimpancé)); Q9MZJ3 (UNIPROT-ID:NKG2A_MACMU (Rhesus macaco)); Q68VD2 (UNIPROT-ID:Q68VD2_MACFA (mono Cynomolgus)); 054872 (UNIPROT-ID:054872 RAT (Rata)); y Q9WU31 (UNIPROT-ID:Q9WU31_MOUSE (Ratón)). Ortólogos no limitativos de CD94 humano incluyen aquellos teniendo Uniprot números de acceso Q9MZ41 (UNIPROT-ID:KLRD1_PANTR (Chimpancé)); Q8MHY9 (UNIPROT-ID: KLRD1_PONPY (Orangután)); Q9MZX9 (UNIPROT-ID:KLRD1_MACMU (Rhesus macaco)); Q68VD4 (UNIPROT-ID: Q68VD4_MACFA (mono Cynomolgus)); 035778 (UNIPROT-ID:035778_RAT(Rata)); 054708 (UNIPROT-ID: 054708_MOUSE(Ratón)); y Q38HS3 (UNIPROT-ID:Q38HS3_CANFA (Perro)). Estas secuencias están disponibles públicamente en el sitio web de Uniprot (de la dirección de la World-Wide Web ebi.uniprot.org/index.shtml).

25 [0050] El polipéptido de inmunoglobulina de las construcciones de la invención puede comprender en toda su longitud o fragmento de una porción Fc de inmunoglobulina, o un variante de esta. En un aspecto, la inmunoglobulina es una secuencia de tipo salvaje de un dominio Fc, o un fragmento de este. También se describe una variante diseñada para promover heterodimerización de las dos proteínas de fusión diferentes, dando como resultado un complejo receptor soluble donde proteína de fusión sS1-Fc1 se funde con sS2-Fc2. En otro aspecto, la variante se diseña para promover heterodimerización de dos receptores diferentes monocatenarios como se describe en este caso.

30 [0051] En aspectos particulares, el dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina deriva de anticuerpos de mamífero humanos o no humanos. En una forma de realización, el dominio constante deriva de un IgG1 humano. En otra forma de realización, el dominio constante deriva de un IgG humano. En otros aspectos, el dominio constante deriva de un no-humano (p. ej., una primate o roedor) IgG molécula (o tipo de anticuerpos que es reconocido como siendo sustancialmente similar al IgG humano en cuanto a composición). La frase "derivado de", en este contexto se refiere a un polipéptido idéntico (100%) o altamente similar en términos de composición de secuencia de aminoácidos (p. ej., al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico) a un dominio de tipo salvaje o referencia ("progenitor") constante de inmunoglobulina, otro cualquiera de los cambios indicados (p. ej., las sustituciones descritas debajo). La frase "derivado de" no está, en este sentido, destinada a indicar el método por el que tal anticuerpo o fragmento de anticuerpos es generado, que puede ser por cualquier método adecuado, tal como expresión recombinante, síntesis de proteína química, etc.

45 [0052] En una forma de realización, la parte del dominio Fc es de tamaño suficiente y composición que esto aumenta la vida media *in vivo* de la construcción (p. ej., debido a espacio más lento de la circulación) en comparación con una construcción que carece del dominio Fc; en todavía otro aspecto particular, la parte del dominio Fc es funcional (es decir, imparte función efectora de anticuerpos al anticuerpo de la construcción).

50 [0053] Dominios constantes de inmunoglobulina de tipo salvaje ejemplares para uso en los presentes constructos incluyen SEC ID n°: 25, representando una murina Fc (mFc) secuencia (clon #669: IMAGE3491766); residuos Val98 a Lys324 de SEC ID NO:21, representando una secuencia IgG1 de murina; residuos Pro100 a Lys330 de SEC ID n°: 20, representando una secuencia IgG1 Fc humana y residuos Glu99 a Lis327 de SEC ID n°: 24, representando una secuencia IgG4 Fc humana. Polipéptidos de inmunoglobulina correspondientes de otras secuencias de tipo salvaje (p. ej., SEC ID n°: 12-19 y 21-23) pueden hacerse usando métodos establecidos en la técnica.

55 [0054] En un aspecto, la invención proporciona versiones mutadas de tales dominios constantes de inmunoglobulina de tipo salvaje. Ahora se ha descubierto que pares de aminoácidos en los dominios constantes de monómeros de anticuerpos están implicados significativamente en la multimerización y estabilidad de tales monómeros de anticuerpos (y en conjunto de moléculas de anticuerpos en el caso de moléculas de anticuerpos tales como moléculas IgG) y pueden, por consiguiente, ser modificados por varios métodos, para promover mejor la formación de monómeros de

anticuerpos o moléculas biespecífica. Típicamente, tales pares de aminoácidos se encuentran principalmente en las cadenas pesadas de moléculas de anticuerpos (p. ej., entre determinados residuos de aminoácidos presentes en las regiones CH1 y CH3 constantes de una molécula IgG).

5 [0055] Por ejemplo, para anticuerpos de inmunoglobulina G humanos, se ha descubierto que fuerzas iónicas, que contribuyen a reticulación de los dos polipéptidos ("HC") de cadena pesada de la molécula de anticuerpo tetramérica, son aportados principalmente por seis aminoácidos presentes en la región CH3 del anticuerpo de la siguiente manera: E240-K253; D282-K292 y K322-D239 (números de posición de secuencia se refieren al inicio del aminoácido desde el principio de CH1 (similar a UNIPROT entrada IGHG1 HUMAN (SEC ID NO:20)).

10 [0056] Aplicación de este descubrimiento a la actual invención, por sustitución de aminoácidos HC de un péptido de inmunoglobulina, conjugado, fundido, o unido a un segmento soluble de una primera subunidad de un antígeno receptor heterodimérico de la siguiente manera. K253E D282K, y K322D, es posible significativamente reducir la homodimerización o "auto-apareamiento" del polipéptido final (que ocurre normalmente en la molécula de anticuerpo tetramérica de tipo salvaje original). De forma similar, modificando la secuencia HC de un segundo polipéptido de inmunoglobulina, conjugado, unido, o fundido a un segmento soluble de una segunda subunidad de un receptor heterodimérico por las sustituciones D239K, E240K y K292D homodimerización de tales polipéptidos es también reducida o anulada.

15 [0057] Coexpresión de los dos polipéptidos, cada uno con segmento soluble de una subunidad receptora heterodimérica diferente, puede "restaurar" interacciones iónicas estabilizantes (p. ej., E240-K253; D282-K292, y K322-D239) y acoplar los polipéptidos, dando como resultado generación de un receptor heterodimérico soluble. La tabla 1 resume (en forma ejemplar) estas distintas sustituciones. Sitios de mutación correspondientes en otros dominios constantes ejemplares se pueden derivar por alineamiento (véase el ejemplo en la figura 7) con IgG1 humano (SEC ID n°: 20). Por ejemplo, como se muestra en la tabla 1, en números sobre residuo 103, el residuo IgG4 correspondiente a un residuo IgG1 se puede obtener substrayendo 3.

20 [0058] El dominio Fc de las construcciones de la invención pueden comprender uno, dos o todas las pares de mutación en la tabla 1. Así, en una forma de realización no limitativa, una construcción heterodimérica de la invención comprende un primer dominio Fc variante comprendiendo una lisina (K) en un residuo correspondiente a residuo 239 en la SEC ID n°: 20 y un ácido aspártico (D) en un residuo correspondiente a residuo 292 en la SEC ID n°: 20, y un segundo dominio Fc variante comprendiendo una lisina en un residuo correspondiente a residuo 282 en la SEC ID n°: 20 y un ácido aspártico (D) en un residuo correspondiente a residuo 322 en la SEC ID n°: 20. Este tipo de construcción se puede referir como construcción de "doble mutación" aquí. En otra forma de realización no limitativa, una construcción heterodimérica de la invención comprende un primer dominio Fc variante comprendiendo lisina (K) en residuos correspondientes a residuos 239 y 240 en la SEC ID n°: 20 y un ácido aspártico (D) en un residuo correspondiente a residuo 292 en la SEC ID n°: 20, y un segundo dominio Fc variante comprendiendo a un ácido glutámico (E) en un residuo correspondiente a residuo 253 en la SEC ID NO:20, una lisina en un residuo correspondiente a residuo 282 en la SEC ID n°: 20 y un ácido aspártico (D) en un residuo correspondiente a residuo 322 en la SEC ID n°: 20. Adicionalmente o alternativamente, uno o más pares de mutación se pueden combinar con otros pares de mutación. Una alternativa ejemplar o par de mutación adicional es, T243Y, Y284T, en referencia a posiciones de residuo en SEC ID n°: 21 (IGHG1_MOUSE).

Tabla 1

45

Sustitución de aminoácido ejemplar en dominios constantes de IgG1 o IgG4 humano, en referencia a SEC ID n°: 20 (UniProt IGHG1_HUMAN) o SEC ID n°: 24 (UniProt IGHG4_HUMAN), respectivamente.			
Anticuerpo 1		Anticuerpo 2	
Mutaciones CH3			
IgG1:	IgG4:	IgG1:	IgG4:
K253E	K250E	E240K	E236K
D282K	D279K	K292D	E237K
K322D	K319D	D239K	R289D
Mutaciones CH1			
		K96E	

50 [0059] Como se describe en este documento, varios dominios Fc de tipo salvaje o de variante de murina también se pueden usar en las construcciones heterodiméricas según la invención. La Figura 8 describe alguno de los dominios de tipo salvaje de murina o variante Fc usados en preparación de construcciones en los ejemplos.

[0060] También se describen receptores donde segmentos diferentes de un polipéptido se unen usando una variedad de métodos convencionales: una parte soluble de una subunidad de un receptor heterodimérico se une a un polipéptido de inmunoglobulina (p. ej., sS1-enlazador-Fc o sS2-enlazador-Fc), o una parte soluble de una primera subunidad a una parte soluble de una segunda subunidad (p. ej., sS1-enlazador-sS2-Fc, sS2-enlazador-sS1-Fc, sS1-enlazador1-sS2-enlazador2-Fc, sS2-enlazador1-sS1-enlazador2-Fc). Segmentos diferentes pueden unirse por, por ejemplo, (1) reticulación química; (2) asociación de afinidad por adición de una fracción, tal como un péptido, a segmentos receptores solubles y/o segmentos de polipéptido de inmunoglobulina, y luego juntando los segmentos vía la fracción anexa o fracciones para formar una proteína híbrida; y (3) conectando segmentos receptores solubles y/o segmentos de polipéptido de inmunoglobulina para formar una única cadena de polipéptido vía un enlazador de polipéptido, es decir, una proteína de fusión.

[0061] En la primera categoría de conexión, cualquier variedad de método convencional puede utilizarse para aparear químicamente (reticulación) dos cadenas de polipéptido. Enlace covalente puede ser conseguida bien por condensación directa de cadenas laterales existentes (p. ej., la formación de enlace bisulfuro entre residuos de cisteína, tal como puede ocurrir naturalmente entre las partes soluble de las subunidades NKG2 y CD94 en determinados receptores CD94/NKG2) o por la incorporación de moléculas de conexión externas. Muchos agentes polivalentes o bivalentes son útiles en los polipéptidos de acoplamiento.

[0062] En general, los agentes de reticulación usados son agentes bifuncionales reactivos, por ejemplo, con grupo de epsilon-amino o grupos tiol. Estos reticuladores se pueden clasificar en dos categorías: reactivos homo- y heterobifuncionales. Reactivos homobifuncionales pueden reaccionar, por ejemplo, con tioles libres (e. g., generados sobre reducción de enlaces de disulfuro), e incluyen, por ejemplo, 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (DNTB), y o-fenilenedimaleimida (O-PDM), que pueden formar un enlace de tioéter entre dos polipéptidos con tales tioles libres. Reactivos heterobifuncionales pueden introducir un grupo reactivo sobre un polipéptido que permite a este reaccionar con un segundo polipéptido. Por ejemplo, N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) puede reaccionar con un grupo amino primario para introducir un grupo tiol libre. Otros agentes de reticulación químicos incluyen, por ejemplo, carbodiimidias, diisocianatos, diazobencenos, hexametileno diaminas, dimaleimida, glutaraldehído, 4succinimidil-oxicarbonil- α -metil a(2-piridiltio) tolueno (SMPT) y n-succinimidilo-S-acetil-tioacetato (SATA). Procedimientos para polipéptidos de reticulación con tales agentes son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Pierce *ImmunoTechnology Catalog & Handbook (1991) E8- E39*; Karpovsky *et al., J. Exp. Med. 1984;160:1686 et seq.*; Liu *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1985;82:8648 et seq.*; and U.S. Pat. 4,676,980.

[0063] Brazos separadores entre los dos grupos reactivos de reticuladores pueden tener varias longitudes y compuestos químicos. Un brazo separador más largo permite una mejor flexibilidad de los polipéptidos conjugados mientras algunos componentes particulares en el puente (p. ej., un grupo benceno) puede prestar estabilidad extra a los grupos reactivos o una resistencia aumentada de la conexión química para la acción de varios aspectos (p. ej., resistencia de enlace bisulfuro para reactivos reductores). El uso de espaciadores peptídicos tal como los enlaces peptídicos o péptidos enlazadores descritos abajo es también contemplado.

[0064] En la segunda categoría de métodos de conexión, métodos convencionales pueden utilizarse para atar cualquiera de una variedad de fracciones (por ejemplo, péptidos) a partes receptoras solubles y/o polipéptidos de inmunoglobulina, generando así proteínas híbridas o de fusión que luego pueden ser asociadas vía las fracciones anexas.

[0065] También se describen receptores donde fracciones tales como biotina y avidina (estreptavidina) son unidas o complejas a partes receptoras solubles y/o polipéptidos de inmunoglobulina, y estas fracciones interactúan para asociar las dos subunidades.

[0066] También se describen receptores donde las fracciones anexas son ambos péptidos, que pueden denominarse aquí "péptidos de promoción de dimerización" entre la amplia variedad de tales enlaces peptídicos que pueden ser usados están la proteína de fusión GST (glutaciona S-transferasa), o un motivo de dimerización de este; un dominio PDZ de dimerización; par de bases FK-506 (proteína de enlace) o un motivo de dimerización de este; un dominio de dimerización de hélice-giro-hélice artificial o natural de p53 y proteína A o su dominio de dimerización, dominio B. En una forma de realización, los péptidos anexos son componentes de una cremallera de leucina. Las fracciones de cremallera de leucina son frecuentemente tomadas de los factores de transcripción humanos c-jun y c-fos.

[0067] El péptido de promoción de dimerización debería proporcionar un grado adecuado de flexibilidad para prevenir que las dos subunidades interfieran con cada actividad de la otra, por ejemplo, por impedimento estérico, y para permitir plegamiento de proteínas apropiado. Por lo tanto, puede ser deseable para modificar un péptido de promoción de dimerización alterando su longitud, composición de aminoácido, y/o conformación, por ejemplo, por adición a esta todavía otras "fracciones de bisagra" o "fracciones enlazadoras secundarias" entre los muchos tipos de fracciones enlazadoras secundarias están, por ejemplo, trectos de pequeños, preferiblemente neutro y no polar o bien polares, aminoácidos tales como, por ejemplo, glicina, serina, treonina o alanina, a varias longitudes y combinaciones; polilisina, o similar. Alternativamente, múltiples enlazadores y/o fracciones enlazadoras secundarias pueden ser usados. Es a veces deseable usar una región de bisagra flexible, tal como, por ejemplo, la región de bisagra de humano IgG, o poliglicina repite interrumpida por serina o treonina a intervalos determinados.

[0068] La longitud y composición de un péptido de promoción de dimerización pueden ser fácilmente seleccionado por uno de habilidad en la técnica para optimizar las propiedades deseadas del receptor soluble, por ejemplo, su capacidad para unirse a su ligando. Un ensayo convencional para unión a anticuerpos se describe en los ejemplos.

[0069] Los péptidos pueden ser añadidos a partes receptoras solubles y polipéptidos de inmunoglobulina por una variedad de métodos que serán evidentes a uno experimentado en la materia, por ejemplo, acoplamiento químico como descrito arriba (si necesario, seguido de derivatización de grupos de aminoácidos apropiados); fijación vía interacciones de biotina/avidina; unión covalente de los polipéptidos por métodos reconocidos en la técnica (p. ej., usando enzimas apropiadas); métodos recombinantes; o combinaciones de estos.

[0070] En la tercera categoría de conexión, partes receptoras solubles y/o polipéptidos de inmunoglobulina se unen de manera covalente vía un enlazador peptídico. En esta categoría, técnicas recombinantes se utilizan para unir partes solubles de cada uno de dos segmentos, en marco, para formar una única molécula de polipéptido de cadena. Preferiblemente, las partes receptoras se separan la una de la otra por un péptido de enlace, de cualquier longitud o composición de aminoácido, de forma más preferida una estructura de bucle flexible, que permite a las dos fracciones receptoras estar a una distancia apropiada la una a la otra y en un alineamiento apropiado para interacción óptima. Péptidos enlazadores típicos contienen tramos de aminoácidos pequeños, preferiblemente neutros y no polares o bien polares tales como, por ejemplo, glicina, serina, treonina o alanina, a varias longitudes y combinaciones; polilisina; o similares. El enlazador peptídico puede tener al menos un aminoácido y puede tener 500 o más aminoácidos. Preferiblemente, el enlazador es inferior a aproximadamente 100 aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente de 2 a 30, de forma más preferida aproximadamente de 3-10 aminoácidos. Dominios enlazadores flexibles, tales como la región de bisagra de IgG humano, o poliglicina se repite interrumpida por serina o treonina a intervalos determinados, pueden ser usados solo o en combinación con otras fracciones. Enlaces ejemplares son aquellos basados en combinaciones de glicina (G), serina (S) y/o arginina (R), incluyendo, pero no limitado a, GS, GSS, GGSGGS (SEC ID n°: 6) y GGSGSRSS (SEC ID n°: 7). En una forma de realización, el enlazador que conecta las primeras y segundas subunidades en un receptor monocatenario heterodimérico es GGSGGS (SEC ID n°: 6). En otra forma de realización, el enlazador que conecta las primeras y segundas subunidades en un receptor monocatenario heterodimérico es GGSGSRSS (SEC ID n°: 7).

[0071] Métodos recombinantes que se pueden usar para generar tales receptores heterodiméricos de cadena lineal única son convencionales. Además, procedimientos de rutina pueden utilizarse para seleccionar péptidos enlazadores y para optimizar parámetros de modo que las dos partes receptoras solubles se alinean a una distancia y en una orientación que permiten función óptima del receptor soluble heterodimérico. Ver, por ejemplo, las patentes US n° 4,935,233 y 4,751,180.

[0072] Por supuesto, dos subunidades pueden ser asociadas vía cualquier combinación de las fracciones anteriores, por ejemplo, una disposición en serie en cualquier orden relativo u orientación.

[0073] Así, en un aspecto, la presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido receptor monocatenario soluble heterodimérico; ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido comprendiendo una parte soluble de al menos una subunidad receptora monomérica, y al menos un ácido nucleico que codifica un péptido de inmunoglobulina se describen también. Por ejemplo, un ácido nucleico codifica una subunidad NKG2 (p. ej., un NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, o subunidad NKG2F) y un polipéptido de inmunoglobulina, un ácido nucleico codifica una subunidad CD94 y un polipéptido de inmunoglobulina, y el receptor heterodimérico codificado se une a un anticuerpo contra el receptor correspondiente CD94/NKG2 o un ligando natural del receptor CD94/NKG2. Por ejemplo, un ácido nucleico puede codificar una subunidad NKG2A y un péptido de inmunoglobulina, un ácido nucleico puede codificar un polipéptido CD94 y un péptido de inmunoglobulina, y el receptor heterodimérico codificado pueden unirse con un ligando CD94/NKG2A tal como HLA-E o un anticuerpo contra un receptor CD94/NKG2A, por ejemplo, receptor humano CD94/NKG2A. En otra forma de realización, un único ácido nucleico aislado codifica un receptor monocatenario heterodimérico comprendiendo ambos una subunidad NKG2, una subunidad CD94 y una subunidad de inmunoglobulina, donde el receptor heterodimérico codificado se une a un ligando CD94/NKG2 tal como HLA-E o un anticuerpo contra un receptor CD94/NKG2. Por ejemplo, un único ácido nucleico aislado puede codificar un receptor heterodimérico monocatenario comprendiendo ambos una subunidad NKG2A (o NKG2C), una subunidad CD94, y una subunidad de inmunoglobulina, donde el receptor heterodimérico codificado se enlaza a HLA-E o un anticuerpo contra el receptor CD94/NKG2A (o CD94/NKG2C).

[0074] De los ácidos nucleicos descritos anteriormente, un ácido nucleico puede codificar una parte soluble del receptor NKG2A expuesto en la SEC ID n°: 1, o una variante u ortólogo de este. En una forma de realización, el ácido nucleico codifica una parte soluble de la subunidad NKG2A comprendiendo los residuos 116-233 de la SEC ID n°: 1. En otra forma de realización, el ácido nucleico codifica una parte soluble de la subunidad NKG2A comprendiendo los residuos 99-233 de la SEC ID n°: 1. En otra forma de realización, el ácido nucleico codifica un fragmento de la subunidad NKG2A que empieza con un residuo seleccionado de los residuos 99-116 y extremos en el residuo 116 de la SEC ID n°: 1. En otra forma de realización, el ácido nucleico codifica una parte soluble de la subunidad NKG2A que consiste en residuos 116-233 de la SEC ID n°: 1. En otra forma de realización, el ácido nucleico codifica una parte soluble de la subunidad NKG2A que consiste en residuos 99-233 de la SEC ID n°: 1.

[0075] En una forma de realización, el ácido nucleico codifica una parte soluble de la subunidad NKG2C comprendiendo los residuos 114-231 de la SEC ID n°: 3. En otra forma de realización, el ácido nucleico codifica una parte soluble de la subunidad NKG2C comprendiendo los residuos 97-231, por ejemplo, 96- 231, de la SEC ID n°: 3. En otra forma de realización, el ácido nucleico codifica un fragmento de la subunidad NKG2C que empieza con un residuo seleccionado de los residuos 96-114 y extremos en el residuo 114 de la SEC ID n°: 3. En otra forma de realización, el ácido nucleico codifica una parte soluble de la subunidad NKG2A que consiste en residuos 114-231 de la SEC ID n°: 3. En otra forma de realización, el ácido nucleico codifica una parte soluble de la subunidad NKG2A que consiste en los residuos 96-231 de la SEC ID n°: 3. Un ácido nucleico puede también o alternativamente codificar una parte soluble del receptor CD94 expuesto en la SEC ID n°: 2. En una forma de realización, el ácido nucleico codifica una parte soluble de la subunidad CD94 comprendiendo los residuos 58-179 de la SEC ID n°: 2. En otra forma de realización, el ácido nucleico codifica una parte soluble de la subunidad CD94 comprendiendo los residuos 35-179 de la SEC ID n°: 2. En otra forma de realización, el ácido nucleico codifica un fragmento de la subunidad CD94 que empieza con un residuo seleccionado de los residuos 35-58 y extremos en el residuo 179 de la SEC ID n°: 2. En otra forma de realización, el ácido nucleico codifica una parte soluble de la subunidad CD94 que consiste en los residuos 58-179 de la SEC ID n°: 2. En otra forma de realización, el ácido nucleico codifica una parte soluble de la subunidad CD94 que consiste en residuos 35-179 de la SEC ID n°: 2.

[0076] Los ácidos nucleicos de la invención pueden también codificar características adicionales de la construcción de receptores heterodimérica, tales como enlaces peptídicos, dominios de multimerización, indentificativos de afinidad, etc. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden además codificar uno o más enlaces peptídicos que conectan una parte soluble de una subunidad de un receptor heterodimérico a un polipéptido de inmunoglobulina (p. ej., sS1-enlazador-Fc o sS2-enlazador-Fc), o una parte soluble de una primera subunidad a una parte soluble de una segunda subunidad (p. ej., sS1-enlazador-sS2-Fc, sS2-enlazador-sS1-Fc, sS1-enlazador1-sS2-enlazador2-Fc, sS2-enlazador1-sS1-enlazador2-Fc). Enlaces ejemplares son aquellos basados en combinaciones de glicina (G), serina (S), y/o arginina (R), incluyendo, pero no limitado a, GS, GSS, GGSGGS (SEC ID n°: 6) y GGSGGSRSS (SEC ID n°: 7). En una forma de realización, el enlazador que conecta las primeras y segundas subunidades en un receptor heterodimérico monocatenario es GGSGGS (SEC ID n°: 6). En otra forma de realización, el enlazador que conecta las primeras y segundas subunidades en un receptor heterodimérico monocatenario es GGSGGSRSS (SEC ID n°: 7).

[0077] En otra forma de realización, los ácidos nucleicos de los vectores de expresión codifican una o más secuencias de señal secretoras, en una forma de realización, la secuencia señal es MPLLLLLPLLWAGALAMD (SEC ID n°: 30).

[0078] Los ácidos nucleicos pueden también codificar uno o más sitios de escisión, particularmente entre segmentos diferentes en una proteína de fusión. Ver, por ejemplo, Tuan *et al.*, *Connective Tissue Research* 1996;34:1-9.

[0079] En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos catalogada en la tabla 2 con o sin secuencias de señal (Sig), al igual que vectores de expresión y células huésped comprendiendo tales ácidos nucleicos. En otro aspecto, la invención proporciona variantes de las secuencias de aminoácidos en la tabla 2. En una forma de realización preferida, la variante codificada se une un ligando natural del receptor humano CD94/NKG2A, o un anticuerpo dirigido contra el receptor humano CD94/NKG2A. En otra forma de realización preferida, la variante codificada se une un ligando natural del receptor humano CD94/NKG2C, o un anticuerpo dirigido contra el receptor humano CD94/NKG2C

Tabla 2

Secuencias de aminoácidos de construcciones de receptores ejemplares solubles CD94/NKG2A (Sig = secuencia señal; mFc = porción Fc de murina; GS, GSS etc. = enlaces basados en glicina (G), serina (S), y arginina (R)). La nomenclatura de dominio Fc se refiere a la designación en la figura 8.	
Designación/Descripción	SEQ ID n°:
CD94-mFc/NKG2A heterodímero (Sig)-(mFc)-GSS-(CD94)/(Sig)-(mFc)-GS-(NKG2A)	31/32
CD94-mFc/NKG2A heterodímero con mutación única (Sig)-(mFc-sm-CD94)-GSS-(CD94) (Sig)-(mFc-sm-NKG2A)-GS-(NKG2A)	33/34
CD94-mFc/NKG2A heterodímero con doble mutación (Sig)-(mFc-dm-CD94)-GSS-(CD94) (Sig)-(mFc-dm-NKG2A)-GS-(NKG2A)	35/36
NKG2A-CD94 monocatenario hexaHis-GST NKG2A-2xGGS- CD94	37

NKG2A-CD94 monocatenario Trx-hexaHis-NKG2A-2xGGS- CD94	38
CD94-NKG2A-mFc monocatenario (Sig)-(mFc)-GS-(NKG2A)- GGS-GGS-RSS-(CD94)	39
CD94-NKG2C-mFc monocatenario (Sig)-(mFc)-GS-(NKG2A)- GGS-GGS-RSS-(CD94)	59

[0080] En otro aspecto, se describe lo siguiente: un primer vector de expresión comprendiendo los elementos siguientes operativamente unidos: (a) un promotor de transcripción; un primer ácido nucleico que codifica una primera subunidad de una parte soluble de un receptor heterodimérico fundido a un polipéptido de inmunoglobulina; y un terminador de transcripción; y un segundo vector de expresión comprendiendo los elementos siguientes operativamente unidos: (b) un segundo promotor de transcripción; un segundo ácido nucleico que codifica una segunda subunidad de una parte soluble de un receptor heterodimérico fundido a un polipéptido de inmunoglobulina; y un terminador de transcripción. En otro aspecto, los primeros y segundos ácidos nucleicos están contenidos dentro de un único vector de expresión, opcionalmente dentro del marco de lectura. En otro aspecto, el vector de expresión comprende los siguientes elementos operativamente unidos: (a) un promotor de transcripción; un primer ácido nucleico que codifica un receptor heterodimérico monocatenario soluble; y un terminador de transcripción. En una forma de realización de cualquiera de los aspectos precedentes, el vector de expresión además codifica secuencias enlazadoras, identificativos de afinidad, o secuencia señal secretora operativamente unida a o comprendida en el ácido nucleico. En otra forma de realización de los aspectos precedentes, el receptor heterodimérico es un receptor CD94/NKG2 humano. En otra forma de realización de los aspectos precedentes, el receptor heterodimérico es el receptor humano CD94/NKG2A. En otra forma de realización de los aspectos precedentes, el receptor heterodimérico es el receptor humano CD94/NKG2C.

[0081] También se describe aquí una célula cultivada comprendiendo al menos uno de los vectores de expresión anteriormente descritos, donde la célula expresa los polipéptidos codificados por el vector de expresión. Una única célula puede contener, por ejemplo, un vector de expresión que codifica una única subunidad de un receptor heterodimérico soluble fundido a un polipéptido de inmunoglobulina (codificando, por ejemplo, sS1-Fc o sS2-Fc), un vector de expresión que codifica ambas primeras y segundas subunidades de un heterodimérico receptor soluble, cada una fundida a un polipéptido de inmunoglobulina (codificando, por ejemplo, sS1-Fc y sS2-Fc), o un vector de expresión que codifica un receptor heterodimérico monocatenario comprendiendo primeras y segundas subunidades de un receptor heterodimérico y un polipéptido de inmunoglobulina (p. ej., sS1-sS2-Fc o sS2-sS1-Fc).

[0082] También se describe aquí un método para producir receptores heterodiméricos solubles por transfección de células huésped con tales vectores de expresión, y expresión de uno o más ácidos nucleicos en una célula o cultivo celular. La célula cultivada comprende un vector de expresión como se describe arriba, donde los primeros y segundos ácidos nucleicos se localizan en el mismo vector de expresión, y la célula expresa los polipéptidos codificados por el vector de expresión. En otro aspecto, la célula cultivada comprende vectores de expresión donde los primeros y segundos ácidos nucleicos se localizan en vectores de expresión independientes y se co-transfectan en la célula, y la célula expresa los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. En otro aspecto, una primera célula huésped se transfecta con un vector de expresión que codifica un primer ácido nucleico por encima, y una segunda célula huésped (del mismo tipo o diferente) se transfecta con un ácido nucleico que codifica un segundo ácido nucleico por encima, y las primeras y segundas células huésped separadamente expresan los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. En una forma de realización de la invención, la célula cultivada comprende un vector de expresión como se describe arriba, donde la célula expresa un polipéptido receptor monocatenario multimérico o heterodimérico soluble codificado por el ácido nucleico. En otro aspecto, la célula cultivada segrega una proteína de fusión monomérica de una parte soluble de una subunidad receptora heterodimérica y un péptido de inmunoglobulina, en otro aspecto, la célula cultivada segrega un complejo heterodimérico o multimérico de polipéptido receptor soluble. En otro aspecto, la célula cultivada segrega un receptor soluble CD94/NKG2 que une un ligando CD94/NKG2 o un anticuerpo contra el receptor monocatenario CD94/NKG2. En otro aspecto, la célula cultivada segrega un receptor soluble CD94/NKG2A que une un ligando CD94/NKG2A o un anticuerpo contra CD94/NKG2A. En otra forma de realización, la célula cultivada segrega un receptor soluble CD94/NKG2C que une un ligando CD94/NKG2C o un anticuerpo contra CD94/NKG2C.

[0083] Aquí se describe un método para producir un polipéptido receptor heterodimérico soluble que forma un complejo multimérico o heterodimérico comprendiendo: cultivo de una célula como se describe arriba y aislamiento los polipéptidos receptores solubles producidos por la célula. En otro aspecto, un método para producir un receptor heterodimérico soluble comprendiendo: co-cultivo de una primera célula que expresa una parte soluble de una primera subunidad de un receptor heterodimérico unido a un primer polipéptido de inmunoglobulina y una segunda célula que expresa una parte soluble de una segunda subunidad de un receptor heterodimérico unido a un segundo polipéptido de inmunoglobulina, y aislamiento de polipéptidos heterodiméricos solubles formados en los medios de cultivo, se describen. En otro aspecto, un método para producir un receptor heterodimérico soluble comprendiendo: separadamente cultivo de una primera célula que expresa una parte soluble de una primera subunidad de un receptor heterodimérico unido a un primer polipéptido de inmunoglobulina y una segunda célula que expresa una parte soluble de una segunda subunidad de un receptor heterodimérico unido a un segundo polipéptido de inmunoglobulina,

separadamente purificación de las primeras y segundas proteínas de fusión de subunidad, mezcla de las primeras y segundas proteínas de fusión de subunidad, y aislamiento de polipéptidos heterodiméricos solubles formados, se describe. Los pasos de aislamiento anteriormente descritos pueden comprender uno o más pasos de purificación según métodos conocidos en la técnica.

5

[0084] En un aspecto, receptores heterodiméricos solubles aislados comprendiendo al menos una proteína híbrida, es decir, una proteína donde dos polipéptidos (típicamente polipéptidos de fusión comprendiendo al menos un receptor y un segmento de inmunoglobulina y/o otro péptido de promoción de dimerización) son unidos vía una interacción distinta a un enlace peptídico (p. ej., enlace bisulfuro, avidina-biotina, cremallera de leucina, etc.), se describen. En este método, los polipéptidos son producidos separadamente por métodos recombinantes, y luego juntados.

10

[0085] Si se desea, las cantidades relativas de dos proteínas de fusión recombinantes producidas en una única célula o cultivo celular pueden ser reguladas, por ejemplo, por expresión de estas a partir de promotores de diferentes fuerzas. Por ejemplo, si el péptido añadido de una primera subunidad A forma homodímeros a una alta frecuencia, mientras que el péptido añadido de una segunda subunidad B forma homodímeros a una baja frecuencia, uno puede conducir la formación de los heterodímeros deseados por niveles mucho más altos de expresión de subunidad B que de A. Las cantidades óptimas relativas se pueden determinar empíricamente por experimentación rutinaria.

15

[0086] También se describe aquí receptores heterodiméricos solubles aislados codificados por los ácidos nucleicos anteriormente descritos. En un aspecto, el polipéptido receptor heterodimérico soluble aislado comprende dos polipéptidos, el primer comprendiendo una parte soluble de una primera subunidad de un receptor heterodimérico unido a un polipéptido de inmunoglobulina, y la segunda comprendiendo una segunda subunidad de un receptor heterodimérico unido a un polipéptido de inmunoglobulina. Los primeros y segundos polipéptidos son asociados preferiblemente, por ejemplo, vía fuerzas iónicas, enlaces covalentes, o una combinación de estas. En receptores heterodiméricos solubles comprendiendo al menos dos polipéptidos, los polipéptidos se pueden asociar por enlace bisulfuro entre las partes de subunidad receptoras o las partes de inmunoglobulina, y/o interacción forzada vía mutaciones en un segmento de inmunoglobulina, como se describe en este documento. En una forma de realización, un polipéptido comprende una subunidad NKG2 (p. ej. NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, o NKG2F) y un péptido de inmunoglobulina, un polipéptido comprende un polipéptido CD94 y un péptido de inmunoglobulina, y el receptor heterodimérico formado se une a un ligando CD94/NKG2 tal como, por ejemplo, un anticuerpo contra el receptor correspondiente CD94/NKG2, o un ligando natural, por ejemplo, HLA-E en el caso de cD94/NKG2A, CD94/NKG2C, etc. En otra forma de realización, el receptor heterodimérico es un polipéptido monocatenario comprendiendo partes solubles de primeras y segundas subunidades de un receptor heterodimérico y un polipéptido de inmunoglobulina. En el caso de receptores heterodiméricos NKG2, el receptor heterodimérico codificado pueden unir con un anticuerpo contra un receptor CD94/NKG2, por ejemplo, un receptor CD94/NKG2 humano, o un ligando natural, por ejemplo, HLA-E en el caso de nKG2A, NKG2C, etc.

20

25

30

35

[0087] El receptor heterodimérico puede comprender una parte soluble de la secuencia NKG2A expuesta en la SEC ID n°: 1, o una variante u ortólogo de esta. En una forma de realización, la parte soluble de la subunidad NKG2A comprende residuos 116-233 de la SEC ID n°: 1. En otra forma de realización, la parte soluble de la subunidad NKG2A comprende residuos 99-233 de la SEC ID n°: 1. En otra forma de realización, la parte soluble comprende un fragmento de la subunidad NKG2A que empieza con un residuo seleccionado de los residuos 99-116 y extremos en el residuo 116 de la SEC ID n°: 1. En otra forma de realización, la parte soluble de la subunidad NKG2A consiste en los residuos 116-233 de la SEC ID n°: 1. En otra forma de realización, la parte soluble de la subunidad NKG2A consiste en los residuos 99-233 de la SEC ID n°: 1.

40

45

[0088] El receptor heterodimérico puede también o alternativamente comprender una parte soluble de la secuencia NKG2C expuesta en la SEC ID n°: 3. En una forma de realización, la subunidad NKG2C comprende los residuos 114-231 de la SEC ID n°: 3. En otra forma de realización, la parte soluble de la subunidad NKG2C comprende los residuos 97-231, por ejemplo, 96-231, de la SEC ID n°: 3. En otra forma de realización, la parte soluble comprende un fragmento de la subunidad NKG2C que empieza con un residuo seleccionado de los residuos 96-114 y extremos en el residuo 114 de la SEC ID n°: 3. En otra forma de realización, la parte soluble de la subunidad NKG2A consiste en residuos los 114-231 de la SEC ID n°: 3. En otra forma de realización, la parte soluble de la subunidad NKG2A consiste en los residuos 96-231 de la SEC ID n°: 3.

50

55

[0089] El receptor heterodimérico puede también o alternativamente comprender una parte soluble de NKG2B, NKG2E, comprendiendo, por ejemplo, el segmento alineado con NKG2A-residuos 99-233.

[0090] El receptor heterodimérico puede comprender una parte soluble del receptor CD94 expuesto en la SEC ID n°: 2, o una variante u ortólogo de esta. En una forma de realización, la parte soluble de la subunidad CD94 comprende los residuos 58-179 de la SEC ID n°: 2. En otra forma de realización, la parte soluble de la subunidad CD94 comprende los residuos 34-179 o 35-179 de la SEC ID n°: 2. En otra forma de realización, la parte soluble comprende un fragmento de la subunidad CD94 que inicia con un residuo seleccionado de los residuos 34-58 y extremos en el residuo 179 de la SEC ID n°: 2. En otra forma de realización, la parte soluble de la subunidad CD94 consiste en los residuos 58-179 de la SEC ID n°: 2. En otra forma de realización, la parte soluble de la subunidad CD94 consiste en los residuos 35-179 de la SEC ID n°: 2.

60

65

[0091] En un aspecto, la invención proporciona polipéptidos con secuencias de aminoácidos al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idénticas a una secuencia de aminoácidos catalogada en la tabla 1, al igual que composiciones farmacéuticas comprendiendo tales polipéptidos. En otro aspecto, la invención proporciona receptores heterodiméricos comprendiendo variantes de las secuencias de aminoácidos en la tabla 2. En una forma de realización, la variante se une a un ligando natural de un receptor CD94/NKG2 humano tal como HLA-E y/o un anticuerpo dirigido contra un receptor CD94/NKG2A humano. La variante puede diferir del progenitor en, por ejemplo, sustituciones de aminoácido conservadoras, como se ha descrito anteriormente, sustituciones de aminoácido no conservadoras, adiciones, y/o deleciones. Por ejemplo, aminoácidos esenciales en los polipéptidos receptores de la presente invención se pueden generar e identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, *Science* 1989;244:1081-1085; Bass *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991,88:4498-4502). En esta técnica, mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad biológica (p. ej., unión de ligandos y transducción de señal) para identificar residuos de aminoácidos que son muy importantes para la actividad de la molécula. Sitios de interacción de ligando-receptor pueden también ser determinados por análisis de estructura cristalina como determinado por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcaje por fotoafinidad. Ver, por ejemplo, de Vos *et al.*, *Science* 1992;255:306-312; Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 1992;224:899-904; Wlodaver *et al.*, *FEBS Lett.* 1992;309:59-64. Las identidades de aminoácidos esenciales puede también ser inferidas de análisis de homologías con receptores relacionados.

[0092] Sustituciones de aminoácido múltiples pueden hacerse y evaluarse usando métodos conocidos de mutagénesis y selección, tales como aquellos descritos por Reidhaar-Olson and Sauer *Science* 1988;241:53-57 o Bowie and Sauer *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989,86:2152-2156. Brevemente, estos autores revelan métodos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionando para polipéptido funcional, y luego secuenciación de los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones admisibles en cada posición. Otros métodos que pueden ser usados incluyen exposición en fago, por ejemplo, Lowman *et al.*, *Biochem.* 1991;30:10832-10837; Ladner *et al.*, Patente US No. 5,223,409; Huse, Publicación OMPI WO 92/06204 y mutagénesis dirigida en la región (Derbyshire *et al.*, *Gene* 46:145, (1986); Ner *et al.*, *DNA* 7: 127, (1988)). Métodos de mutagénesis como se describe arriba se pueden combinar con métodos de selección de rendimiento alto para detectar actividad de receptores clonados, mutagenizados en células huésped. Ensayos preferidos a este respecto incluyen ensayos de proliferación celular y ensayos de unión de ligandos a base de biosensor, que se describen debajo. Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican receptores heterodiméricos activos o partes de estos (p. ej., fragmentos de unión de ligandos) se pueden recuperar de las células huésped y rápidamente ordenar usando equipamiento de módem. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

[0093] Lo siguiente describe algunos aspectos adicionales ejemplares de la invención:

[0094] En un aspecto, la invención proporciona un receptor monocatenario soluble CD94/NKG2 comprendiendo una parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 y una parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94. La construcción monocatenaria puede, en un aspecto, además comprender un polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo todo o parte de un dominio Fc o variante de este. Así, la invención también proporciona un receptor monocatenario soluble CD94/NKG2 comprendiendo una parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2, una parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, y un polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo todo o parte de un dominio Fc o variante de este. En una forma de realización, en el receptor monocatenario soluble CD94/NKG2, el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se puede unir al N-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2, y el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 se une al polipéptido de inmunoglobulina. En otra forma de realización, en el receptor monocatenario soluble CD94/NKG2, el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 se une al N-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, y el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se une al polipéptido de inmunoglobulina. En el receptor monocatenario soluble CD94/NKG2, la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2, la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, y, en formas de realización comprendiendo un polipéptido de inmunoglobulina, el polipéptido de inmunoglobulina, puede ser asociado por, por ejemplo, enlace covalente. Por ejemplo, la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 y parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se puede unir por un enlazador peptídico comprendiendo glicina y serina.

[0095] En otro aspecto, la invención proporciona un receptor monocatenario soluble CD94/NKG2A comprendiendo una parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2A y una parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94. La construcción monocatenaria puede, en un aspecto, además comprender un polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo todo o parte de un dominio Fc o variante de este. Así, la invención también proporciona un receptor monocatenario soluble CD94/NKG2A comprendiendo una parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2A, una parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, y un polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo todo o parte de un dominio Fc o variante de este. En una forma de realización, en el receptor monocatenario soluble CD94/NKG2A, el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se puede unir al N-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2A, y el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2A se une al polipéptido de inmunoglobulina. En otra forma de realización, en el receptor monocatenario soluble

CD94/NKG2A, el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2A se une al N- terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, y el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se une al polipéptido de inmunoglobulina. En el receptor monocatenario soluble CD94/NKG2A, la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2A, la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, y, en formas de realización comprendiendo un polipéptido de inmunoglobulina, el polipéptido de inmunoglobulina, puede ser asociado por, por ejemplo, enlace covalente. Por ejemplo, la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2A y parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se pueden unir por un enlazador peptídico comprendiendo glicina y serina.

[0096] En otro aspecto, la invención proporciona un receptor monocatenario soluble CD94/NKG2C comprendiendo una parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2C y una parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94. La construcción monocatenaria puede, en un aspecto, además comprender un polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo todo o parte de un dominio Fc o variante de este. Así, la invención también proporciona un receptor monocatenario soluble CD94/NKG2C comprendiendo una parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2C, una parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, y un polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo todo o parte de un dominio Fc o variante de este. En una forma de realización, en el receptor monocatenario soluble CD94/NKG2C, el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se puede unir al N- terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2C, y el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2C se une al polipéptido de inmunoglobulina. En otra forma de realización, en el receptor monocatenario soluble CD94/NKG2C, el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2C se une al N- terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, y el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se une al polipéptido de inmunoglobulina. En el receptor monocatenario soluble CD94/NKG2C, la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2C, la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, y, en formas de realización comprendiendo un polipéptido de inmunoglobulina, el polipéptido de inmunoglobulina, puede ser asociado por, por ejemplo, enlace covalente. Por ejemplo, la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2C y parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se puede unir por un enlazador peptídico comprendiendo glicina y serina.

[0097] En otro aspecto, la invención proporciona un dímero de cualquier receptor monocatenario soluble CD94/NKG2, CD94/NKG2A o CD94/NKG2C anteriormente descritos.

[0098] En otro aspecto, la invención proporciona un receptor soluble CD94/NKG2 comprendiendo una subunidad NKG2 comprendiendo una parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 y una subunidad CD94 comprendiendo una parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, donde al menos una de la subunidad NKG2 y subunidad CD94 comprende un polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo todo o parte de un dominio Fc o variante de este, donde ejemplos no limitativos de subunidades NKG2 son NKG2Cy NKG2A. El polipéptido de inmunoglobulina puede, por ejemplo, comprender una parte de un dominio IgG Fc que aumenta la vida media *in vivo* de la construcción. En una forma de realización, el polipéptido de inmunoglobulina es un dominio Fc funcional. En otra forma de realización, el dominio Fc es de un anticuerpo IgG4. En otra forma de realización, el dominio Fc es de un anticuerpo IgG1.

[0099] En otro aspecto, solo una de las subunidades CD94 y NKG2 se une a un polipéptido de inmunoglobulina. El polipéptido de inmunoglobulina puede, por ejemplo, ser unido a la parte C-terminal de la subunidad. En una forma de realización, las subunidades CD94 y NKG2 son unidas vía un enlazador peptídico. Por ejemplo, el enlazador peptídico puede comprender la secuencia GGSGGS (SEC ID n°: 6) o GGSGGSRSS (SEC ID n°: 7). En una forma de realización particular, la subunidad NKG2A es unida de manera covalente al polipéptido de inmunoglobulina. En una forma de realización alternativa, la subunidad CD94 es unida de manera covalente al polipéptido de inmunoglobulina.

[0100] En otro aspecto, cada una de las subunidades CD94 y NKG2 es unida de manera covalente a un polipéptido de inmunoglobulina. Por ejemplo, el N-terminal de la subunidad NKG2 se puede enlazar al C-terminal de un primer polipéptido de inmunoglobulina para formar un primer polipéptido, y el N-terminal de la subunidad CD94 se puede unir al C-terminal de un segundo polipéptido de inmunoglobulina para formar un segundo polipéptido. En una forma de realización, los primeros y segundos polipéptidos de inmunoglobulina son variantes de un dominio Fc IgG1 humano, el primer polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo sustituciones, correspondientes a K253E, D282K y K322D, y el segundo polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo sustituciones, correspondientes a D239K, E240K y K292D, o viceversa. En otra forma de realización, los primeros y segundos polipéptidos de inmunoglobulina son variantes de un dominio Fc IgG4 humano, el primer polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo sustituciones correspondientes a K250E, D279K y K319D, y el segundo polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo sustituciones, correspondientes a E236K, E237K, R289D, o viceversa.

[0101] En cualquiera de los aspectos precedentes, la subunidad NKG2 puede ser NKG2A donde la secuencia de aminoácidos NKG2A puede ser, por ejemplo, aquella de NKG2A humano (SEC ID n°: 1). Por ejemplo, la subunidad NKG2A puede comprender los residuos 99- 233 de la SEC ID n°: 1.

[0102] En cualquiera de los aspectos precedentes, la subunidad NKG2 puede ser alternativamente NKG2C donde la secuencia de aminoácidos NKG2C puede ser, por ejemplo, aquella de NKG2C humano (SEC ID n°: 3). Por ejemplo, la subunidad NKG2C puede comprender los residuos 96-231 de la SEC ID n°: 3.

[0103] En cualquiera de los aspectos precedentes, la secuencia de aminoácidos CD94 puede ser la SEC ID n°: 2. Por ejemplo, la subunidad CD94 puede comprender los residuos 35-179 de la SEC ID n°: 2.

5 [0104] En cualquiera de los aspectos precedentes, el polipéptido de inmunoglobulina puede comprender en toda su longitud o fragmento de una secuencia seleccionada de la SEC ID n°: 12-29. Una construcción heterodimérica comprendiendo en toda su longitud o un fragmento de cada uno de la SEC ID n°: 12-29 es una forma de realización específica y separada según la invención.

10 [0105] En cualquiera de los aspectos precedentes, el polipéptido de inmunoglobulina puede ser unido de manera covalente a una secuencia señal. Por ejemplo, la secuencia señal puede comprender la secuencia de la SEC ID n°: 30.

15 [0106] En aspectos alternativos o adicionales, la invención proporciona receptor soluble CD94/NKG2A comprendiendo las secuencias de SEC ID n°: 31 y 32, SEC ID n°: 33 y 34, SEC ID n°: 35 y 36, SEC ID n°: 37, SEC ID n°: 38, y SEC ID n°: 39 o un receptor soluble CD94/NKG2C comprendiendo la SEC ID n°: 59.

20 [0107] En otro aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican el receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de los aspectos precedentes. También se proporciona para una célula transformada con un vector de expresión comprendiendo tales ácidos nucleicos, donde la célula puede ser, por ejemplo, una célula procariota o célula eucariota. También se proporciona para un método para producir un receptor soluble CD94/NKG2, comprendiendo cultivo de dicha célula bajo condiciones adecuadas para la expresión del receptor soluble CD94/NKG2.

25 [0108] En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica comprendiendo una cantidad eficaz del receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de los aspectos precedentes y un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente.

30 [0109] En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo contra un receptor CD94/NKG2 tal como, por ejemplo, CD94/NKG2A, el método comprendiendo: inoculación de un animal con un receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de los aspectos precedentes, donde el polipéptido suscita una respuesta inmunitaria en el animal para producir el anticuerpos y aislamiento del anticuerpo del animal.

Preparación de receptores heterodiméricos solubles

35 [0110] Los polipéptidos receptores heterodiméricos de la presente invención se pueden producir en células huésped creadas genéticamente según técnicas convencionales.

40 [0111] Células huésped adecuadas son aquellos tipos celulares que pueden ser transformados o transfectados con ADN exógeno y crecidos en el cultivo, e incluyen bacterias, células fúngicas y células eucariotas cultivadas más altas. Células eucariotas, células particularmente cultivadas de organismos pluricelulares, son preferidas. Técnicas para manipular moléculas de ADN clonadas e introducir ADN exógeno en una variedad de células huésped se describe en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1989).

45 [0112] En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido receptor soluble heterodimérico es operativamente unido a otros elementos genéticos requeridos para su expresión, incluyendo generalmente un promotor de transcripción y terminador, dentro de un vector de expresión. El vector también comúnmente contendrá uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque expertos en la técnica reconocen que dentro de marcadores seleccionables de sistemas determinados se pueden proporcionar en vectores separados, y replicación del ADN exógeno se puede proporcionar por integración en el genoma de la célula huésped. Selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es una materia de diseño de rutina en el nivel de habilidad común en la técnica. Muchos de estos elementos son descritos en la literatura y están disponibles a través de proveedores comerciales. Componentes múltiples de un complejo receptor soluble se puede co-transfectar en vectores de expresión individuales o ser contenidos en un único vector de expresión. Tales técnicas de componentes múltiples de expresión de complejos de proteína se conocen bien en la técnica.

50 [0113] Para dirigir un polipéptido receptor heterodimérico en la vía secretora de una célula huésped, una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, prepro secuencia o pre secuencia) se puede proporcionar en el vector de expresión. La secuencia señal secretora puede ser aquella del receptor, o se puede derivar de otra proteína segregada (por ejemplo; t-PA) o sintetizado de *novo*. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN de polipéptido receptora heterodimérica en el marco de lectura correcto. Secuencias señal secretoras se sitúan comúnmente 5' a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque secuencias de señal determinadas se pueden situar en otro lugar en la secuencia de ADN de interés (ver, por ejemplo, Welch *et al.*, U.S. Patent No. 5,037,743 ; Holland *et al.*, U.S. Patent No. 5,143,830).

65 [0114] Células mamíferas cultivadas son huéspedes preferidos en la presente invención.

[0115] Métodos para introducir ADN exógeno en las células huésped mamíferas incluyen transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler *et al.*, *Cell* 11978;4:725 *et seq.*; Corsaro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 1981;7:603 *et seq.*; Graham and Van der Eb, *Virology* 1973;52:456 *et seq.*, electroporación (Neumann *et al.*, *EMBO J.* 1982;1:841-845), transfección mediada por dextrano DEAE (Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987), y transfección mediada por liposoma (Hawley-Nelson *et al.*, *Focus* 1993;15:73 *et seq.*; Ciccarone *et al.*, *Focus* 1993;15:80 *et seq.*). La producción de polipéptidos recombinantes en células mamíferas cultivadas se describe, por ejemplo, por Levinson *et al.*, patente US n° 4,713,339; Hagen *et al.*, patente US n° 4,784,950; Pahniten *et al.*, patente US n° 4,579,821; y Ringold, patente US n° 4,656,134. Células de mamífero adecuadas cultivadas incluyen las líneas celulares COS-1 (ATCC n° CRL 1650), COS-7 (ATCC n° CRL 1651), BHK (ATCC n° CRL 1632), BHK 570 (ATCC n° CRL 10314), 293 (ATCC n° CRL 1573 Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977) y ovario de hámster chino (p. ej. CHO-K1 ATCC n° CCL 61). En una forma de realización, la célula es dependiente de un factor de crecimiento hematopoyético suministrado exógenamente para su proliferación. Líneas celulares preferidas de este tipo son la línea celular TF-1 humana (Número ATCC CRL 2003) y la línea celular AML 193 (Número ATCC CRL-9589), que son líneas celulares leucémicas dependientes GM-CSF y BaF3 (Palacios and Steinmetz, *Cell* 41: 727-734, (1995)) que es una línea celular pre-B dependiente de murina IL-3. Líneas celulares adicionales adecuadas se conocen en la técnica y están disponibles de depositarios públicos tales como la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. En general, promotores de transcripción fuerte son preferidos, tales como promotores de SV-40 o citomegalovirus. Ver, por ejemplo, la patente US n°. 4, 956,288. Otros promotores adecuados incluyen aquellos de genes de metalotioneína (U.S. patente n° 4, 579,821 y 4,601,978) y el promotor tardío de adenovirus importante.

[0116] Selección de medicamento es generalmente usada para seleccionar células mamíferas cultivadas en las que ADN extranjero ha sido insertado. Tales células son comúnmente referidas como "transfectantes". Células que han sido cultivadas en presencia del agente selectivo y son capaces de pasar el gen de interés a su progenie son referidos como "transfectantes estables". Un marcador seleccionable preferido es una resistencia de gen que codifica al antibiótico neomicina. Selección se realiza en presencia de un medicamento tipo neomycin, tal como G-418 o similar. Sistemas de selección pueden también ser usados para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un proceso referido como "amplificación".

[0117] Amplificación se realiza por transfectantes de cultivo en presencia de un bajo nivel del agente selectivo y luego aumentando la cantidad de agente selectivo para seleccionar células que producen niveles altos de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable preferido amplificable es dihidrofolato-reductasa, que confiere resistencia a metotrexato. Otros genes de resistencia a medicamentos (p. ej. resistencia a higromicina, resistencia a multifármaco, acetiltransferasa de puomicina) también pueden usarse.

[0118] Otras células eucariotas más altas también pueden usarse como huéspedes, incluyendo células de insecto, células vegetales y células aviares. Transformación de células de insecto y producción de polipéptidos extranjeros en estas se describe en Guarino *et al.*, patente US n° 5,162,222; Bang *et al.*, patente US n° 4,775,624; y WIPO publicación WO 94/06463. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como un vector para genes de expresión en células vegetales ha sido reviado por Sinkar *et al.*, *J. BioSci. (Bangalore)* 11: 47-58; (1987).

[0119] Células fúngicas, incluyendo células de levadura, y particularmente células del género *Saccharomyces*, también pueden usarse en la presente invención, tal como para producir polipéptidos de fusión. Métodos para transformar células de levadura con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de lo que se describe por, por ejemplo, Kawasaki, patente US n° 4,599,311; Kawasaki *et al.*, patente US n° 4,931,373; Brake, patente US n° 4,870,008; Welch *et al.*, patente US n° 5,037,743; y Murray *et al.*, patente US n° 4,845,075. Células transformadas se seleccionan por fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente resistencia a medicamento o la capacidad para crecer en ausencia de un nutriente particular (p. ej., leucina). Un sistema vector preferido para uso en la levadura es el sistema de vector POT1 descrito por Kawasaki *et al.* (patente US n° 4,931,373), que permite a células transformadas ser seleccionadas por crecimiento en la glucosa con medio. Promotores adecuados y terminadores para uso en la levadura incluyen aquellos de genes de enzima glicolíticos (ver, por ejemplo, Kawasaki, patente US n° 4,599,311; Kingsman *et al.*, patente US n° 4,615,974; y Bitter, patente US n° 4,977, 092) y genes de alcohol deshidrogenasa. Ver también patentes US n° 4,990,446, 5,063,154, 5,139,936 y 4,661,454. Sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guillennondiii* y *Candida maltosa* se conocen en la técnica. Ver, por ejemplo, Gleeson *et al.*, *J. Gen. Microbiol.* 1986,132:3459-3465 y Cregg, patente US n° 4,882,279. Células de *Aspergillus* se pueden utilizar según los métodos de McKnight *et al.*, patente US n° 4,935,349. Métodos para transformación de *Acremonium chrisogenum* son descritos por Sumino *et al.*, patente US n° 5,162, 228. Métodos para transformación de *Neurospora* se describen por Lainbowitz, patente US n° 4,486,533.

[0120] Células huésped transformadas o transfectadas se cultivan según procedimientos convencionales en un medio de cultivo con nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células huésped elegidas. Una variedad de medios adecuados, incluyendo medios definidos y medios complejos, se conocen en la técnica y generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios pueden contener también tales componentes como factores de crecimiento o suero, según sea necesario. El medio de crecimiento generalmente selecciona células con el ADN añadido exógenamente por, por ejemplo,

selección de medicamento o deficiencia de un nutriente esencial que se implementa por el marcador seleccionable soportado en el vector de expresión o co-transfectado en la célula huésped.

5 [0121] Preferiblemente, un receptor heterodimérico soluble de la invención es "aislado," e.g. está en una forma distinta a la que ocurre en la naturaleza, por ejemplo, en un tampón, en una forma seca esperando reconstitución, como parte de un kit o una composición farmacéutica, etc. El término "polipéptido aislado" se refiere a un receptor heterodimérico soluble de la presente invención que (1) ha sido separado de al menos aproximadamente 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, carbohidratos u otros materiales (es decir, contaminantes) con los cuales es naturalmente asociado. Preferiblemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de cualquier otro polipéptido contaminante u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico o de investigación.

15 [0122] Una variedad de métodos convencionales pueden utilizarse para aislar y/o purificar un receptor heterodimérico soluble de la invención, o para aislar y/o purificar sus componentes de polipéptido diferentes antes de juntarlos. Receptores solubles de la invención y/o sus subunidades se pueden recuperar de células bien como proteínas solubles (preferiblemente después de haber sido segregadas en el fluido de cultivo) o como cuerpos de inclusión, donde pueden ser extraídos de forma cuantitativa, por ejemplo, por 8M hidrocloreuro de guanidinio y diálisis. Métodos de purificación convencionales que se pueden usar incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de fase inversa, y/o filtración de gel. En una forma de realización preferida, 20 cromatografía de afinidad se usa, por ejemplo, con una columna con proteína A o proteína G, que puede unirse con las fracciones Fc presentes en determinados receptores solubles. En otra forma de realización, cada polipéptido es "etiquetado" con una fracción, preferiblemente una divisible, que puede unirse con una columna de afinidad apropiada. Por ejemplo, una o ambas subunidades se pueden etiquetar con poli His (por ejemplo; H'S6) para permitir purificación rápida por cromatografía de metal-quelato; con una marca Strep que se une a estreptavidina y se puede ser eluir con iminobiotina; con proteína de enlace de maltosa (MBP), que se une a aynilose y se puede eluir con maltosa; o con cualquier otra fracción de este tipo que se puede separar por cromatografía de afinidad. Alternativamente, uno puede marcar una o ambas de las subunidades con epítomos a los anticuerpos que están disponibles, tales como el péptido FLAGO, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp- Asp-Lys (Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, CT). Para métodos típicos del uso de etiquetas de afinidad, ver, por ejemplo, *Recombinant Protein Protocols: Detection and Isolation, Edited by Rocky S. Tuan, Methods in Molecular Biology, Vol. 63, Humana Press, 1997* y los ejemplos 5 y 30 6.

[0123] Combinaciones de cualquiera de los tipos anteriores de métodos de purificación también se pueden usar.

35 [0124] La pureza de los receptores puede ser determinada usando métodos de estándar incluyendo, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía en columna y análisis de secuencia de aminoácidos aminoterminal.

40 [0125] Unión de los receptores heterodiméricos solubles a, por ejemplo, un ligando natural del receptor heterodimérico o un anticuerpo contra el receptor heterodimérico nativo puede ser evaluado por métodos convencionales. Un sistema de ensayo preferido que utiliza una construcción receptora de enlace de ligandos usa un instrumento biosensor comercialmente disponible (BIAcoreTm, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ), donde el ligando, un anticuerpo, o un fragmento de este se inmoviliza sobre la superficie de un chip receptor. Uso de este instrumento se describe en *Karlsson, J. Immunol. Methods 145:229-240, (1991)* y *Cunningham and Wells, J. Mol. Biol. 234:554-563; (1993)*. El ligando, anticuerpo, o fragmento es unido de manera covalente, usando química de amino o sulfhidril, a fibras de dextrano que se fijan a película de oro en la célula de flujo. Una muestra para ensayo se pasa a través de la célula. Si la construcción receptora heterodimérica soluble en la muestra se une al ligando o anticuerpo, se unirá con el ligando inmovilizado o anticuerpo, causando un cambio en el índice de refracción del medio, que se detecta como un cambio en la resonancia de plasmón de superficie de la película de oro. Este sistema permite la determinación de tasas de "asociación-disociación" donde afinidad de enlace puede ser calculada, y evaluación de estequiometría de unión.

50 [0126] Polipéptidos receptores de enlace de ligandos pueden también ser evaluados por otros sistemas de ensayo conocidos en la técnica. Tales sistemas incluyen análisis de Scatchard para determinación de afinidad de enlace. Ver, *Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 1949,51: 660-672*, y ensayos calorimétricos (*Cunningham et al., Science 1991;253:545-548; Cunningham et al., Science 1991; 254:821-825*).

60 [0127] La estabilidad del receptor se puede evaluar por almacenamiento de este bajo condiciones diferentes (p. ej., temperatura, pH, en diferentes tampones) para varias longitudes de tiempo. Estabilidad funcional es luego evaluada por análisis de la capacidad de enlace. Por ejemplo, CD94/NKG2C o CD94/NKG2A soluble se pueden evaluar para su capacidad para unir su ligando (HLA-E) o anticuerpos anti-CD94/NKG2C o CD94/NKG2A específicos (p. ej. Z199; Z270, HP-3D9, FAB138P) en un BiaCore o ensayo similar después de almacenamiento durante varios periodos de tiempo y bajo condiciones de almacenamiento diferentes. El porcentaje de unión de un CD94/NKG2 almacenado en comparación con una referencia soluble CD94/NKG2 (que puede, por ejemplo, haber sido almacenado bajo condiciones estándar) puede ser una medida de su estabilidad.

65 Uso de receptores heterodiméricos solubles

[0128] Aspectos particulares de la invención se refieren al uso de las construcciones de receptores heterodiméricos solubles como agentes de inmunización, investigación y herramientas de selección, reactivos de diagnóstico y agentes terapéuticos.

[0129] En un aspecto, la invención proporciona un método para inmunización de un animal con un receptor heterodimérico soluble según la invención para suscitar respuesta de un anticuerpo contra el receptor heterodimérico. Ventajas ejemplares del uso de las construcciones de receptores heterodiméricos solubles de la invención en vez de fragmentos solubles solo incluyen vida media más larga, corrección de pliegue tridimensional del receptor y una bobina receptora eficaz en APC facilitado por la marca Fc (promoviendo así una respuesta de anticuerpo más robusta). Anticuerpos contra el receptor heterodimérico pueden luego ser recogidos de la sangre (preparación de anticuerpo policlonal) u obtenidos a partir de producción de anticuerpo B usando técnicas de hibridoma de células o además establecer tecnologías para producción de anticuerpo monoclonal. En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo a un receptor soluble heterodimérico comprendiendo: inmunización de un animal con un receptor soluble heterodimérico descrito aquí, donde el polipéptido suscita una respuesta inmunitaria en el animal para producir el anticuerpos y aislamiento del anticuerpo del animal.

[0130] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo producido por el método como se describe arriba, que específicamente se une a un complejo receptor multimérico o heterodimérico soluble comprendiendo un receptor heterodimérico soluble como se describe en este documento. En una forma de realización, el anticuerpo descrito arriba es un anticuerpo monoclonal.

[0131] El paso de inmunización de un mamífero no humano con un antígeno se puede llevar a cabo de cualquier manera bien conocida en la técnica para la estimulación de la producción de anticuerpos en un ratón (ver, por ejemplo, E. Harlow and D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)). El receptor soluble heterodimérico, o un fragmento de este, es suspendido o disuelto en un tampón, opcionalmente con un adyuvante, tal como adyuvante de Freund completo. Métodos para determinar la cantidad de inmunógeno, tipos de taponos y cantidades de adyuvante se conocen por los de habilidad en la técnica. Estos parámetros pueden ser diferentes para inmunógenos diferentes, pero se dilucidan fácilmente.

[0132] De forma similar, la ubicación y frecuencia de inmunización suficiente para estimular la producción de anticuerpos son también bien conocidos en la técnica. En un protocolo de inmunización típica, los animales no humanos se inyectan intraperitonealmente con antígeno en el día 1 y nuevamente aproximadamente una semana más tarde. Esto va seguido de retirada de inyecciones del antígeno alrededor del día 20, opcionalmente con adyuvante tal como adyuvante de Freund incompleto. El retiro de inyecciones se realiza por vía intravenosa y se pueden repetir durante diferentes días consecutivos. Este va seguido de una reinyección en el día 40, bien por vía intravenosa o intraperitonealmente, típicamente sin adyuvante. Este protocolo produce la producción de anticuerpo específico de antígeno que produce células B después de aproximadamente 40 días. Otros protocolos pueden también ser utilizados mientras ellos suponen la producción de células B que expresan un anticuerpo dirigido al antígeno usado en inmunización.

[0133] Para preparación de anticuerpo policlonal, suero se obtiene de un animal inmunizado no humano y los anticuerpos presentes en estos aislados por técnicas bien conocidas. El suero puede ser de afinidad purificado usando cualquiera de los inmunógenos expuestos arriba unido a un soporte sólido para obtener anticuerpos que reaccionan con el receptor heterodimérico soluble o células que expresan el receptor heterodimérico nativo.

[0134] Para producción de anticuerpos monoclonales, un mamífero no humano se inmuniza con cualquier receptor heterodimérico soluble descrito aquí, incluyendo cualquier secuencia en toda su longitud, cualquier secuencia extracelular, o cualquier fragmento de esta. Esplenocitos son luego aislados y posteriormente fundidos con un célula inmortalizada para formar un hibridoma que produce anticuerpo. El aislamiento de esplenocitos de un mamífero no humano es bien conocido en la técnica e implica típicamente eliminar el bazo de un mamífero no humano anestesiado, cortándolo en piezas pequeñas y apretando los esplenocitos de la cápsula de esplénico y a través de una malla de nilón de un depurador celular en un tampón apropiado para producir una única suspensión celular. Las células son lavadas, centrifugadas y resuspendidas en un tampón que lisa cualquier glóbulo rojo. La solución es otra vez centrifugada y los linfocitos restantes en el granulado son finalmente resuspendidos en el tampón fresco.

[0135] Una vez aislados y presentes en suspensión de célula única, los linfocitos se funden a una línea celular inmortal. Esto es típicamente una línea celular de mieloma de ratón, aunque muchas otras líneas celulares inmortales útiles para crear hibridomas se conocen en la técnica. Líneas de mieloma de murinas preferidas incluyen, pero de forma no limitativa, aquellas derivadas de MOPC-21 y MPC-11 tumores de ratón disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. E.E.U.U., o X63 Ag8653 y SP-2 células disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland E.E.U.U.. La fusión es efectuada usando el polietileno glicol o similares. Los hibridomas resultantes son luego crecidos en medios selectivos que contienen una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parental no fundidas. Por ejemplo, si las células de mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina fosforibosil guanina transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluye típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), estas sustancias previenen el crecimiento de células HGPRT deficitarias.

5 [0136] Los hibridomas son típicamente crecidos en un estrato alimentador de macrófagos. Los macrófagos son preferiblemente de la misma camada del mamífero no humano usado para aislar esplenocitos y son típicamente cebados con adyuvante de Freund incompleto o similares varios días antes de poner en placas los hibridomas. Métodos de fusión se describen en (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice," pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

10 [0137] A las células se les permite crecer en los medios de selección durante tiempo suficiente para formación de colonia y producción de anticuerpos; normalmente entre 7 y 14 días. Las colonias de hibridoma son luego evaluadas para la producción de anticuerpos que se unen el receptor soluble heterodimérico o células que expresan el receptor heterodimérico nativo. El ensayo es típicamente un ensayo colorimétrico tipo ELISA, aunque otros tipos diferentes de ensayos pueden ser empleados, incluyendo inmunoprecipitación, radioinmunoanálisis, ensayos Biacore (ver arriba), o ensayos de proximidad de centelleo (SPA), bien conocidos en la técnica. Los pocillos positivos para la producción de anticuerpo deseada se examinan para determinar si una o más colonias diferentes están presentes. Si más de una colonia está presente, las células se pueden reclonar y crecer para asegurar que solo una única célula ha dado origen a la colonia que produce el anticuerpo deseado. Pocillos positivos con una única colonia aparente son típicamente reclonados y re-evaluados para asegurar que solo un anticuerpo monoclonal está siendo detectado y producido.

20 [0138] Hibridomas que se confirma que producen un anticuerpo monoclonal de esta invención son luego crecidos en cantidades más grandes en un medio apropiado, tal como DMEM o RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma puede ser crecidas *in vivo* como tumores ascites en un animal.

25 [0139] Después de crecimiento suficiente para producir el anticuerpo monoclonal deseado, los medios de crecimiento con anticuerpo monoclonal (o el fluido ascites) se separa fuera de las células y el anticuerpo monoclonal presente en este es purificado. Purificación es típicamente conseguida por cromatografía usando proteína A o proteína G-sefarosa, o un anti-ratón Ig unido a un soporte sólido tal como agarosa o perlas de sefarosa (todos descritos, por ejemplo, en el *Antibody Purification Handbook, Amersham Biosciences, publication No. 18-1037-46, Edition AC*). El anticuerpo unido es típicamente eluido a partir de columnas de proteínaA/proteína G usando tampones de pH bajo (tampones de glicina o de acetato de pH 3,0 o menos) con neutralización inmediata de fracciones con anticuerpo. Estas fracciones son agrupadas, dializadas y concentradas según se necesite.

35 [0140] Alternativamente, el ADN que codifica un anticuerpo de la invención es aislado del hibridoma, colocado en un vector de expresión apropiado para transfección en un huésped apropiado. El huésped es luego usado para la producción recombinante del anticuerpo, o variantes de este, tal como una versión humanizada de este anticuerpo monoclonal, fragmentos activos del anticuerpo o anticuerpos quiméricos comprendiendo la parte de reconocimiento de antígeno del anticuerpo.

40 [0141] En un aspecto alternativo o adicional de la invención, los receptores solubles de la invención tales como, por ejemplo, receptores solubles CD94/NKG2, se pueden usar en métodos para selección de agentes de unión NKG2 y/o CD94 para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Por ejemplo, uno o más receptores monocatenarios solubles CD94/NKG2 se pueden utilizar en tales métodos, tales como, por ejemplo, CD94/NKG2A monocatenario, CD94/NKG2C monocatenario, CD94/NKG2B monocatenario, CD94/NKG2E monocatenario y/o CD94/NKG2F monocatenario. Agentes ejemplares incluyen, pero de forma no limitativa, anticuerpos contra CD94, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, y/o NKG2F al igual que fragmentos de unión del antígeno o derivados de tales anticuerpos. Para fragmentos de anticuerpo ejemplares, ver, por ejemplo, Holliger and Hudson (*Nat Biotechnol 2005;23:1126-1136*).

50 [0142] En una forma de realización, la invención así proporciona un método para producir un compuesto de unión del antígeno anti-NKG2, comprendiendo: (a) proporción de un compuesto de unión del antígeno que específicamente se une a un polipéptido NKG2; (b) prueba del compuesto de unión del antígeno para unión a un receptor soluble CD94/NKG2A descrito aquí; (c) selección del compuesto de unión del antígeno si se determina que el compuesto de unión del antígeno se une al receptor soluble CD94/NKG2A; y (d) opcionalmente, producción de una cantidad del compuesto de unión del antígeno seleccionado.

55 [0143] En otra forma de realización, la invención proporciona un método para producir un compuesto de unión del antígeno anti-NKG2, el método comprendiendo: (a) producción de una cantidad de un compuesto de unión del antígeno que específicamente se une a un polipéptido NKG2; (b) prueba de una muestra de dicha cantidad de un compuesto de unión del antígeno para unión a un receptor soluble CD94/NKG2 descrito aquí; (c) selección de la cantidad para uso como un medicamento y/o en la producción de un medicamento si se determina que el compuesto de unión del antígeno se une al receptor soluble CD94/NKG2; y (d) opcionalmente, preparación de la cantidad para administración a un humano, opcionalmente, formulación de una cantidad del compuesto de unión seleccionado de antígeno con un portador farmacéuticamente aceptable.

65 [0144] En otra forma de realización, la invención proporciona un método para producir un compuesto de unión del antígeno anti-NKG2, el método comprendiendo: (a) proporción de una pluralidad de compuestos de unión del antígeno que específicamente se unen con un polipéptido NKG2, (b) prueba de cada uno de los compuestos de unión del antígeno para unión a un receptor soluble CD94/NKG2 descrito aquí; (c) selección de un compuesto de unión del

antígeno si se determina que el compuesto de unión del antígeno se une a dicho receptor soluble CD94/NKG2; y (d) opcionalmente, hacer que el compuesto de unión del antígeno sea adecuado para administración humana; y/o (e) opcionalmente, producción de una cantidad del compuesto de unión del antígeno seleccionado.

5 [0145] Los métodos anteriores pueden comprender también hacer que el compuesto de unión del antígeno sea adecuado para humano haciendo, por ejemplo, el compuesto de unión del antígeno humanizado o quimérico. Los métodos anteriores pueden comprender también producción de una cantidad de compuesto de unión del antígeno que comprende cultivo de una célula que expresa el compuesto de unión del antígeno en un medio adecuado y recuperación del compuesto de unión del antígeno. En formas de realización específicas, el compuesto de unión del antígeno en los
10 métodos anteriores puede comprender un anticuerpo o un fragmento de unión del antígeno de este. El polipéptido NKG2 puede ser seleccionado de, por ejemplo, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, y/o NKG2F. Por ejemplo, el compuesto de unión del antígeno puede unirse con uno o más de NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, y NKG2F. En una forma de realización específica, la unión del antígeno compuesto se une al menos a NKG2A. En otra forma de realización específica, el compuesto de unión del antígeno se une al menos a NKG2C.

15 [0146] La invención también se refiere a métodos de detección de moléculas HLA-E (en, por ejemplo, ensayos de diagnóstico o experimentales), comprendiendo prueba A de contacto que puede contener moléculas HLA-E con un receptor heterodimérico soluble según la invención. En una forma de realización, el receptor soluble heterodimérico es una construcción de receptor CD94/NKG2C o CD94/NKG2A monocatenario como se describe en este documento. El receptor heterodimérico soluble se puede marcar con una fracción convencional detectable usada para este tipo de fines, por ejemplo, una entidad fluorescente o radiactiva. Alternativamente, métodos indirectos tales como, por ejemplo, conjugar el receptor heterodimérico soluble para una enzima capaz de conversión de un sustrato no detectable a un producto detectable, o un anticuerpo secundario contra una porción Fc del heterodimérico receptor soluble, pueden ser utilizados. Tales ensayos pueden, por supuesto, ser cuantitativos. En una forma de realización, tal ensayo se utiliza para
20 determinar si una muestra biológica tomada de un paciente contiene células que expresan HLA-E en la superficie celular. En otra forma de realización, tal ensayo se utiliza para determinar si un agente de interés causa un aumento o reducción en una célula de la cantidad de HLA-E que está disponible para unión a CD94/NKG2C o CD94/NKG2A (p. ej., células humanas o de murina; en una probeta, muestra de tejido, en el cultivo, o en un animal) y/o si este modula (inhibe o realza) la actividad biológica de HLA-E (p. ej., su unión a un receptor soluble). Muestras ejemplares biológicas incluyen, pero de forma no limitativa, muestras tumorales obtenidas por, por ejemplo, biopsia o cirugía; y muestras de sangre.

[0147] En otro aspecto, la invención proporciona un método para específicamente dirigirse a células de expresión de HLA-E o de sobre-expresión de HLA-E en un sujeto administrando un receptor heterodimérico soluble según la
35 invención. La porción Fc del CD94/NKG2C o CD94/NKG2A soluble puede luego funcionar como dominio efector para inducir citólisis de la célula de expresión HLA-E vía una respuesta CDC y/o ADCC.

[0148] En otro aspecto, un receptor soluble heterodimérico se usa para purificación de un ligando receptor o un anticuerpo contra el receptor nativo. El receptor heterodimérico soluble se inmoviliza en un soporte sólido, tal como perlas de agarosa, agarosa reticulada, vidrio, resinas celulósicas, resinas basadas en sílice, poliestireno, poliacrilamida reticulada, o como materiales que son estables bajo las condiciones de uso. El receptor heterodimérico soluble puede también ser unido vía su porción Fc a, por ejemplo, una columna de afinidad de proteína A o proteína G. Métodos para conectar polipéptidos a soportes sólidos se conocen en la técnica, e incluyen química de amina, activación de bromuro cianógeno, activación de N-hidroxisuccinimida, activación epóxida, activación de sulfhidril, y activación de hidracida. Los medios resultantes pueden generalmente ser configurados en forma de una columna, y fluidos con ligando se pasan a través de la columna una o más veces para permitir al ligando unirse al receptor. El ligando es luego eluido usando cambios en la concentración de sal o pH para disgregar unión de ligando-receptor.

Ensayos de citotoxicidad

50 [0149] En una forma de realización particular, la invención proporciona agentes tales como construcciones de receptores solubles CD94/NKG2A y anticuerpos generados contra tales construcciones de receptores solubles CD94/NKG2A. Para determinar si tales construcciones o anticuerpos pueden reducir o bloquear interacciones de CD94/NKG2A con HLA-E, y así aumentar la citotoxicidad de linfocitos CD94/NKG2A restringidos, las siguientes pruebas
55 puede ser realizadas.

[0150] Actividad celular NK puede ser evaluada usando una célula basada en ensayos de citotoxicidad, por ejemplo, midiendo liberación de cromo u otro parámetro para valorar la capacidad del anticuerpo para estimular células NK a matar células diana tales como células P815, K562, o células tumorales apropiadas como se describen en Sivori *et al.*, *J. Exp. Med.* 1997;186:1129-1136; Vitale *et al.*, *J. Exp. Med.* 1998; 187:2065-2072; Pessino *et al. J. Exp. Med.* 1998;188:953-960; Neri *et al. Clin. Diag. Lab. Immun.* 2001;8:1131-1135; Pende *et al. J. Exp. Med.* 1999;190:1505-1516. En un ensayo ejemplar, la capacidad de un agente para reducir señalización mediada por CD94/NKG2A se puede evaluar en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de 4-horas estándar usando, por ejemplo, células NKL que expresan CD94/NKG2A, y células diana que expresan HLA-E. Tales células NKL eficazmente no matan dianas que expresan HLA-E porque CD94/NKG2A reconoce a HLA-E, llevando a iniciación y propagación de señalización inhibitoria que impide citólisis mediada por linfocito. Tal ensayo de citotoxicidad *in vitro* puede llevarse a cabo por métodos estándar

que se conocen bien en la técnica, como se describe, por ejemplo, en Coligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993). Las células diana se marcan con ^{51}Cr antes de adición de células NK, y luego la matanza se estima como proporcional a la liberación de ^{51}Cr de las células al medio, como resultado de la matanza. Adición de un agente que impide CD94/NKG2A de unión a HLA-E produce prevención de la iniciación y propagación de señalización inhibitoria vía CD94/NKG2A. Por lo tanto, adición de tales agentes produce aumentos en la matanza mediada por linfocito de las células diana. Este paso así identifica agentes que previenen señalización inducida por CD94/NKG2A negativa por, por ejemplo, bloqueo de unión de ligandos. En un particular, ensayo de citotoxicidad de liberación ^{51}Cr , células de efector NK que expresan CD94/NKG2A pueden matar HLA-e-negativo LCL 721.221 células diana, pero menos eficaces que HLA-e-expresión de LCL 721.221-Cw3 células. En cambio, células de efector YTS que carecen de CD94/NKG2A matan ambas líneas de célula eficazmente. Así, células efectoras NK no pueden matar células HLA-E⁺ LCL 721.221-Cw3 debido a señalización inducida por HLA-E inhibitoria vía CD94/NKG2A. Cuando células NK se preincuban con bloqueo de anticuerpos anti-CD94/NKG2A según la presente invención en tal ensayo de citotoxicidad de liberación ^{51}Cr , HLA-e-expresión LCL 721.221-Cw3 células se matan en una forma concentración-anticuerpo-dependiente.

[0151] La actividad inhibitoria o potenciadora de un receptor o composición de anticuerpos de esta invención se puede evaluar en cualquier número de otras vías, por ejemplo, por su efecto en el calcio intracelular libre como se describe, por ejemplo, en Sivori *et al.*, *J. Exp. Med.* 1997, 186:1129-1136.

[0152] Actividad celular NK puede también ser dirigida usando un ensayo de liberación de citocina, donde células NK se incuban con la construcción de receptores o anticuerpo para estimular la producción de citocina de las células NK (por ejemplo, producción de TNF y IFN- α). En un protocolo ejemplar, producción de IFN- γ de PBMC se evalúa por superficie celular y coloración intracitoplásmica y análisis por citometría de flujo después de 4 días en el cultivo. Brevemente, Brefeldin A (Sigma Aldrich) se añade a una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante las últimas 4 horas de cultivo. Las células son luego incubadas con anti-CD3 y anti-CD56 mAb previo a permeabilización (IntraPreTM; Beckman Coulter) y coloración con PE-anti-IFN- γ o PE-IgG1 (Pharmingen). Producción de GM-CSF y IFN- γ a partir de células NK policlonales activadas se mide en sobrenadantes usando ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN, IFN-: OptEIA set, Pharmingen).

[0153] Los compuestos de esta invención, incluyendo construcciones de receptores y anticuerpos, pueden mostrar actividad inhibitoria parcial, por ejemplo, parcialmente reducen la inhibición mediada por CD94/NKG2A de citotoxicidad celular NK. En una forma de realización, preparación de un anticuerpo causa al menos un 10% de aumento en citotoxicidad NK, preferiblemente al menos un 40% o 50% de aumento en citotoxicidad NK, o más preferiblemente al menos un 70% de aumento en citotoxicidad NK. Muchos compuestos preferidos son capaces de inhibir (o estimular, en el caso de receptores activantes) al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, 40% o 50% o más de la actividad de la célula NK, por ejemplo, como medido en un ensayo de toxicidad celular, en comparación con células en ausencia del compuesto. También preferido, el compuesto puede proporcionar un aumento de depleción de células diana por 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000%, o más relativamente al nivel de depleción en ausencia del compuesto. Alternativamente, los compuestos de esta invención son capaces de inducir la lisis de población de células diana autólogas, unidas o compatibles, es decir, población celular que no sería eficazmente lisada por células NK en ausencia de dicho anticuerpo. Por consiguiente, compuestos de esta invención pueden también ser definidos como que facilitan actividad celular NK *in vivo*.

Composiciones farmacéuticas

[0154] La invención también proporciona composiciones que comprenden un receptor heterodimérico soluble o anticuerpo (incluyendo fragmentos y derivados de estos), en cualquier vehículo adecuado en una cantidad eficaz para potencia detectablemente citotoxicidad de linfocito en un paciente o en una muestra biológica comprendiendo linfocitos y, opcionalmente, células diana que expresan HLA-e. La composición comprende además un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente. Tales portadores y excipientes son bien conocidos en la técnica, y son descritos en, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, 1995.

[0155] El término "muestra biológica", como se utiliza en este caso, incluye, pero no está limitado a, un fluido biológico (por ejemplo suero, linfa, o sangre), muestra celular o muestra de tejido (por ejemplo, médula ósea).

[0156] Además aspectos y ventajas de esta invención se describirán en la siguiente sección experimental, que debería ser considerada como ilustrativo y no limitando el alcance de esta solicitud.

Ejemplos

Ejemplo 1: Modelaje de interacción CD94/NKG2A con HLA-E

[0157] Este ejemplo describe en el modelado *in silico* identificación de segmentos CD94/NKG2A que cubren la interacción con HLA-E. La base de datos de proteína (PDB; Protein Data Bank) denominada en este caso es descrita en: H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne: *The Protein*

Data Bank. Nucleic Acids Research, 28 pp. 235-242 (2000). Identificadores PDB son siempre 4 caracteres alfanuméricos, por ejemplo, 1 NKR & 1OM3, algunas veces referido como 1NKR.pdb y 1 OM3.pdb.

5 [0158] Un modelo de complejo CD94/NKG2A con su ligando HLA-E fue construido *in silico*. Para esto, un modelo del heterodímero CD94/NKG2A fue construido usando la estructura de rayos X del homodímero CD94 como un modelo de homología (PDB-ID: 1B6E). Además, la estructura cristalina resuelta de HLA-E fue usada (PDB-ID:1MHE). El complejo de HLA-E y CD94/NKG2A fue luego construido *in silico*, usando la estructura de rayos X del complejo NKG2D-MICA relacionado (PDB-ID:1 HYR). El modelo completo se muestra en la Figura 4.

10 [0159] El modelo fue consistente con estudios mutacionales que identifican los residuos HLA-E R65; D69; Q72; R75; R79; H155; D162; E166 como los residuos de interacción (H. Wada *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 2004. 34, 81-90). En el alineamiento de CD94, NKG2A y NKG2D, el modelo también identifica un residuo muy importante para acoplarse con CD94: F107 (CD94), F165 (NKG2A). El residuo correspondiendo no está conservado en NKG2D.

15 [0160] El modelo también identificó que los N- y C- terminales estuvieron muy juntos. En el modelo, mostrado en la figura 4, la distancia fue 13,2 un entre los carbonos alfa del C-terminal CD94 y el N-terminal NKG2A, y 14,7 un entre carbonos alfa del N-terminal CD94 y el C-terminal NKG2A. Por comparación, la longitud de un residuo de aminoácido es aproximadamente 3,75 A, y la longitud de, por ejemplo, un enlazador GGSGG (SEC ID n°: 6) es aproximadamente 22,5 A.

20 **Ejemplo 2 - Identificación de residuos de aminoácidos responsables de interacciones iónicas en inmunoglobulinas**

25 [0161] Referencias para números de posición de región constante de cadena pesada aquí específicamente indican la posición de la secuencia de región constante de tipo salvaje empezando del principio (N-terminal) de CH1 (similar a Uniprot-id:IGHG1_HUMAN (SEQ ID n°: 20). Para posiciones de cadena ligera constantes, la numeración es según Uniprot-id:KAC_HUMAN (SEQ ID n°: 10). Los aminoácidos responsables de las interacciones iónicas en IgG1 s humano fueron identificados usando un análisis de estructuras de rayos X disponible para la interacciones dominio-dominio CH3 - CH3 de los alotipos GM y KM, y estructuras de rayos X disponibles para interacciones CH1 - CKappa y CH1 - CLambda.

30 [0162] Específicamente, las siguientes estructuras de rayos X KM fueron analizadas: 1 HZH, 1ZA6, 1OQX, 1OQO, 1 L6X; las siguientes estructuras de rayos X GM fueron analizadas: 1T89, 1T83, 1IIX, 1 H3X; las siguientes estructuras de rayos X CH1 - CKappa fueron analizadas: 1TZG, 1 HZH; y la siguiente estructura de rayos X CH1 - CLambda fue analizada: 2RCS.

35 [0163] Alineamiento de los dominios constantes de alotipos GM (SEC ID NO:8) y KM (SEC ID NO:9) se muestran en la figura 5. Alineamiento de los dominios constantes de Kappa (SEC ID NO:10) y Lambda (SEC ID NO:11) se muestran en la figura 6.

40 [0164] Usando métodos estándar en los paquetes de modelaje moleculares disponibles, por ejemplo, MOE (Molecular Operating Environment) software disponible de Chemical Computing Group (www.chemcomp.com), interacciones intramoleculares iónicas fueron identificadas. Este análisis específicamente lleva a la identificación de interacciones iónicas 6 CH3-CH3 GM, interacciones iónicas 6 CH3-CH3 KM, 2 CH1-CKappa y interacciones 2 CH1-CLambda todas catalogadas debajo.

45 CH3-CH3 KM: D239-K322, E240-K253, D282-K292
 CH3-CH3 GM: E239-K322, E240-K253, D282-K292
 CKappa-CH1: E15-K96, D14-K101
 CLambda-CH1: E16-K96, E17-K30

50 **Ejemplo 3: Modificación de aminoácidos en primeros y segundos pares de cadena pesada cadena ligera para promover formación de heterodímero**

55 [0165] Residuos de aminoácidos implicados en las interacciones descritas anteriormente fueron sometidos a sustituciones en dos pares de cadena pesada cadena ligera de distintos anticuerpos con especificidades diferentes en orden para aumentar la energía de (requeridas para) interacciones homodiméricas y así favorecer interacciones heterodiméricas. El mismo principio se puede aplicar a interacciones de cadena pesada-ligera y para receptores heterodiméricos solubles.

60	CH3-Sin modificar	<->	CH3-Sin modificar
	D239	<->	K322
	E240	<->	K253
	K292	<->	D282
	K322	<->	D239
65	K253	<->	E240
	D282	<->	K292.

[0166] Sugerir las modificaciones, K322D, K253E, D282K en la cadena de A y D239K, E240K, K292D en la cadena B conduce a una interacción CH3-Modificado-A<->CH3-Modificado-B con solo pares coincidentes de la siguiente manera:

5 D239 <-> K322
E240 <-> K253
K292 <-> D282

10 D322 <-> K239
E253 <-> K240
K282 <-> D292.

[0167] La interacción CH3-Modificada-A<->CH3-Modificada-A se vuelve:

15 D239 <-> D322
E240 <-> E253
K292 <-> K282
D322 <-> D239
20 E253 <-> E240
K282 <-> K292,

con solo pares de repulsión de carga.

25 [0168] Un método similar se puede aplicar para el GM e interacciones de cadena pesada-ligera.

[0169] Basado en la alta homología de inmunoglobulinas, una homología estructural puede ser predicha, y las interacciones anteriormente descritas tienen equivalentes para otros isotipos humanos (IgG2-4) y IgG de ratón y rata. Para identificar los residuos correspondientes, un alineamiento ha sido realizado y se muestra en la Figura 7.

30 [0170] Respecto a la conservación de cadena pesada, se puede concluir lo siguiente:

- D239 o E239 se conserva en todos los subtipos y especies
- K322 se conserva en los todos subtipos y especies
- 35 • E240 se conserva en humanos, rata IgG1; IgG2a, ratón IgG2a
- K253 se conserva en humanos, rata IgG1; IgG2a
- D282 se conserva en todos los subtipos y especies salvo IgG1 de ratón
- K322 se conserva en todos los subtipos y especies
- K96 se conserva en todos los subtipos y especies salvo IgG3 humano
- 40 • K101 o R101 se conserva en todos los subtipos y especies salvo IgG2b de ratón
- K30 se conserva en todos los subtipos y especies salvo IgG3 humano

[0171] Respecto a la conservación de cadena ligera, se puede concluir lo siguiente:

- 45 • E15 se conserva en humano y ratones (rata no investigado)
- D14 no se conserva
- E16 se conserva en humano y ratones (rata no investigado)
- E17 se conserva en humano y ratones (rata no investigado).

50 **Ejemplo 3: Clonación de hCD94 humano soluble (hCD94) y hNKG2A humano (hNKG2A)**

[0172] CD94 humano (hCD94) y NKG2A humano (hNKG2A) fueron clonados de una genoteca de ADNc NK humano comprada de Spring Bioscience (#PHD-138). Cebadores fueron diseñados usando secuencias de la base de datos NCBI con números de registro U30610 (hCD94) y AF461812 (hNKG2A). Cebadores usados para hCD94 fueron

55 5' GGATCCTCTTTTACTAACTGAGTATTGAGCCAGC (directo; SEC ID n°: 40), y
5' GCGGCCGCAGATCTATTAAATGAGCTGTTGCTTACAGATATAACG, (inverso SEC ID n°: 41).

[0173] Cebadores usados para hNKG2A fueron

60 5' GGATCCCAGAGGCACAACAATTCTTCCCTG (directo, SEC ID n°: 42)
5' GCGGCCGCAGATCTATTAAAGCTTATGCTTACAATG, (inverso SEC ID n°: 43).

65 [0174] Los cebadores directos contuvieron un sitio de restricción de BamHI y los cebadores inversos contuvieron sitios de restricción NotI y BglII. Los productos fueron amplificados usando un procedimiento de PCR de toma de contacto.

[0175] hCD94 soluble originó un fragmento de 438 pares de bases que fue clonado en pCR4blunt-Topo y secuencia verificada. hNKG2A soluble (405 pares de bases) fue clonada en pCR2.1-TOPO y clones correctos fueron identificados por secuenciación.

5 **Ejemplo 4: Construcciones que expresan mFc-hNKG2A o mFc-hCD94 para células mamíferas**

[0176] Murina Fc (mFc) fue clonada a partir de un clon de IMAGE #2651217. Los cebadores usados fueron

5'GCTAGCATGCCGCTGCTGCTACTGCTGCCCTGCTGTGGGCAGGGGCCCTG
GCTATGGATGTGCCAGGGATTGTGGTTG (directo , SEC ID NO:44)

10 5'GGATCCTTACCAGGAGAGTGGGAGAGGC, (inverso SEC ID NO:45)

[0177] El cebador directo contiene un sitio de restricción NheI seguido de péptido señal CD33 y un residuo met y uno asp. El cebador inverso contiene un sitio de restricción BamHI. PCR se efectuó en 50 µl de reacción usando 300 ng de molde, 200 µM dNTP de mezcla, enzima de clonación Easy-A de alta fidelidad PCR y tampón de Stratagene #600400. Un único paso de desnaturalización a 94 C/2 min fue seguido de 15 ciclos como dado: 94°C/30 seg; 68°C/30 seg; 72°C/90 seg, finalizando con 72°C/10 min. El producto PCR fue separado en un 1 % agarosa con EtBr, purificado con kit GFX de Amersham Biosciences #27-9602-01 y clonado en pCR4-TOPO (Invitrogen) y secuenciado.

[0178] mFc fue insertado en pcDNA3.1 o pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen) usando los sitios de restricción NheI y BamHI. hCD94 fue insertado en pcDNA3.1 con mFc usando BamHI y NotI (pBF5) y hNKG2A fue insertado en pcDNA3.1/Hygro de la misma manera (pBF6). Ver las figuras 9 e 10.

pBF6 codifica la siguiente (SEC ID NO:31):

25 [0179]

1 MPLLLLLLLWAGALAMDVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL
51 ITLTPKVTVCVVVDDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQFNSTFRS
101 VSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIP
151 PPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDG
201 SYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKLSLHSPGKGSQRH
251 NNSLNTRTQKARHCGHCPEEWITYSNSCYIGKERRTWEESLLACTSKN
301 SLLSIDNEEEMKFLSIIPSSWIGVFRNSSHHPWVTMNGLAFKHEIKDS
351 DNAELNCAVLQVNRLKSAQCGSSIIYHCKHKL

pBF5 codifica la siguiente (SEC ID n°: 32):

30 [0180]

1 MPLLLLLLLWAGALAMDVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL
51 ITLTPKVTVCVVVDDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQFNSTFRS
101 VSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIP
151 PPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDG
201 SYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKLSLHSPGKGSST
251 KLSIEPAFTPGPNIELQKSDCCSCQEKWVGYRCNCYFISSEQKTWNESR
301 HLCASQKSSLLQLQNTDELDFMSSSQFYWIGLSYSEEHTAWLWENGSA
351 SQYLFPSFETFNTKNCIAYNPNGNALDESCEDKNRYICKQQLI

35 **Ejemplo 5: Construcciones de porción Fc mutadas para expresión de célula mamífera**

[0181] Mutaciones en la parte mFc fueron conseguidas usando mutagénesis Quikchange en las construcciones en el ejemplo 3. La única mutación (hecho como T243Y, Y284T en la SEC ID n°: 21 [IGHG1_MOUSE; IgG1] correspondiente

a T249Y, Y290T en la SEC ID n°: 14 [GCAA_MOUSE; IgG2A]) fue llevado a cabo usando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange II y manual de Stratagene #200523 y low siguiente 2 conjuntos de cebadores:

5' GGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGTAAGTGCATGATAACAGACTTC (SEC ID n°: 46)
 5' GAAGTCTGTTATCATGCAGTACAGACTGACTTTATCCTTGGCC (SEC ID n°: 47)
 y
 5' CAGATGGCTCTTACTTCGTCACCAGCAAGCTCAATGTGCAGAAG (SEC ID n°: 48)
 5' CTTCTGCACATTGAGCTTGCTGGTGACGAAGTAAGAGCCATCTG (SEC ID n°: 49).

[0182] Un único paso de desnaturalización a 95°C/30 seg fue seguido de 15 ciclos como dado: 95°C/30 seg; 55°C/1 min; 68°C/7 min., finalizando con 72°C/10 min.

[0183] Las mutaciones dobles (K292D y E239K en un péptido Fc, K332E y D282K en el otro péptido Fc) fueron llevados a cabo usando el kit de mutagénesis dirigida QuickChange y manual (stratagene) #200513 y los conjuntos de cebadores siguientes:

E239K: CCATTCCACCTCCCAAGAAGCAGATGGCCAAGG (SEC ID n°: 50)
 K292D: GCTCTTACTTCGCTCTACAGCGACCTCAATGTGCAGAAGAGCAAC (SEC ID n°: 51), y
 D282K: GAACACTCAGCCCATCATGAAGACAGATGGCTCTTACTTCG (SEC ID n°: 52)
 K332E: CCACCATACTGAGGAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGG (SEC ID n°: 53).

[0184] Un único paso de desnaturalización a 95°C/1 min fue seguido de 30 ciclos como dado: 95°C/1 min; 55°C/1 min; 65°C/13.5 min.

Ejemplo 6: NKG2A-CD94 monocatenario para la expresión en células mamíferas

[0185] NKG2A-2xGGS-CD94 fue clonado en pcDNA3.1/Hygro con mFc en el sitio de BamHI/NotI (pBF17). Ver la Figura 11.

pBF17 codifica la siguiente (SEC ID NO:39):

[0186]

```

1      MPLLLLLLPLLWAGALAMDVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL
51     ITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQFNSTFRS
101    VSELPIMHQDWLNGKEFKRCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIP
151    PPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDG
201    SYFVYSKLVNMQSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGKGSQRH
251    NNSSLNTRTQKARHCGHCPEEWITYSNSCYIYIGKERRTWEESLLACTSKN
301    SLLSIDNEEEMKFLSIIPSSWIGVFRNSSHHPWVTMNGLAFKHEIKDS
351    DNAELNCAVLQVNRLKSAQCSSIIYHCKHKLGGSGGSRSSFTKLSIEPA
401    FTPGPNIELQKSDCCSCQEKWVGRCNCYFISSEQKTWNESRHLCASQK
451    SLLQLQNTDELDFMSSSQQFYWIGLSYSEEHTAWLWENGSAALSQYLFPS
501    FETFNTKNCIAYNPNGNALDESCEDKNRYICKQQLI
    
```

Ejemplo 7: Expresión en células mamíferas

[0187] Todas las construcciones en los ejemplos 2-5 fueron expresadas transitorios en células HEK293 usando 293fectin #12347-019 de Invitrogen para transfección. 5 x 10⁵ células/ml fueron sembradas en un 125 ml matraz Erlen-Meyer. El día siguiente, las células fueron modificadas de la siguiente manera: 30 µg de ADN fue diluido en 1 ml de Opti-Mem y 40 µl de 293fectin fue diluido en 960 µl de Opti-Mem. Después de 5 min. a temperatura ambiente (RT), las dos mezclas fueron mezcladas e incubadas 25 min. a RT antes de la adición al cultivo celular. Medios fueron recogidos 4-6 días más tarde por centrifugado a 1500 x g durante 15 min. Los resultados fueron visualizados por análisis de transferencia western, donde todas las manchas fueron evaluadas con cabra-anti-ratón-IgG.

[0188] Resultados ejemplares de análisis de transferencia western se muestran en las Figuras 12A-12C. Todas las manchas fueron evaluadas con cabra-anti-ratón-IgG. mFc-CD94 y mFc-NKG2A fueron expresados individualmente en HEK293. MFc-NKG2A no fue expresado en ausencia de mFc-CD94. mFc-monocatenario-NKG2A-CD94 fue expresado en HEK293.

Ejemplo 8: Purificación de heterodímeros CD94-mFc/NKG2A-mFc producidos en líneas celulares mamíferas

[0189] Seis variantes diferentes de proteínas de fusión CD94-mFc y NKG2A-mFc fueron purificadas de sobrenadantes de cultivo celular por cromatografía de afinidad de proteína A. Las proteínas de fusión fueron CD94-mFc homodímero, CD94-2xGGS- NKG2A-mFc, NKG2A-mFc, CD94-mFc(T249Y) NKG2A-mFc(Y290T), CD94-mFc NKG2A-mFc, CD94-mFc(E239K, K292D) NKG2A-mFc(D282K, K332E). Proteínas de fusión CD94/NKG2A-ratón Fc fueron producidas usando medio sin suero. Proteína de fusión CD94/NKG2A-ratón Fc fue expresada de células CHO-DUKX B11.

[0190] Purificación de proteínas de fusión CD94/NKG2A-ratón Fc fue realizada de la siguiente manera. Sobrenadantes de cultivo celular fueron filtrados estériles y aplicados a 10 ml de columna de sefrosa de proteína A (Sigma, St. Louis, Mo) embalados en una columna XK16 (GE-Healthcare, Hillerød, Dinamarca) usando un sistema FPLC de explorador AKTA (GE-Healthcare, Hillerød, Dinamarca). La columna de proteína A fue equilibrada en 20 mM de Tris pH 7,5 en 6 ml/min. Después de aplicación de muestra, la columna fue lavada hasta que absorbancia UV a 280 nm fue baja. Las proteínas unidas fueron eluidas usando un gradiente de paso de 0 a 100% 50 mM de glicina pH 2,7 y 2 ml de fracciones fueron recogidas. Fracciones con las proteínas de interés fueron agrupadas y valoradas a pH neutro. En algunos casos las proteínas agrupadas fueron concentradas usando un Vivaspin 20, 30.000 MWCO (Sartorius, Roskilde, Dinamarca) y tampón cambiado en tampón PBS. Concentraciones de proteína fueron determinadas por OD280 con un coeficiente de extensión de $(1,5 \text{ g/l})^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

[0191] Las proteínas purificadas fueron analizadas por 1-d SDS-PAGE en 4-12% de geles NuPage (Invitrogen, Carlsbad, CA) ejecutados en tampón MOPS. Geles 1-d fueron manchados usando coloración Gelcode coomassie (Pierce, Rockford, IL) o transferido sobre membranas VDF (Invitrogen, Carlsbad, CA).

[0192] Los anticuerpos Z199 (anti-NKG2A, Beckman Coulter, Fullerton, CA) y HP-3D9 (anti-CD59, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) fueron preparados para transferencia western por etiquetado con Cy3 y Cy5 usando kits de etiquetado de proteína Cy-dye (GE-Healthcare, Hillerød, Dinamarca). Después de transferencia, las membranas fueron bloqueadas en 5% de blotto (Pierce, Rockford, IL) e incubadas con ambos anticuerpos diluidos 1:200 en el tampón de lavado. Después de lavado, las manchas fueron escaneadas en bien un escáner Ettan Dige Imager o un Typhoon Trio+ (GE-Healthcare, Hillerød, Dinamarca) usando los ajustes para los dos fluoróforos diferentes.

Resultados

[0193] Proteínas purificadas de 330-350 ml de sobrenadante del cultivo sin suero de células HEK293 produjeron 0, 8 a 1, 7 mg de proteína. Ver la tabla 3. Las cantidades de proteína más grandes fueron purificadas a partir de células que expresan los dos plásmidos con una única mutación en la región constante de inmunoglobulina de murina. Análisis de las proteínas purificadas por 1-d SDS PAGE mostró que la purificación dio bastante proteínas puras sin contaminantes obvios presentes. La banda principal correspondió a formación de dímero de las proteínas, mientras que unas especies de peso molecular más alto correspondieron a formación de tetrámero.

Tabla 3

Proteínas purificadas de suero sin expresión en células en células "estilo libre" HEK293		
Proteína	Construcciones de plásmido	Cantidad (mg)
CD94-mFc homodímero	pBF5	0,37
CD94-2xGGS-NKG2A-mFc	pBF17	0,18
NKG2A-mFc	pBF6	0,27
CD94-mFc T249Y NKG2A-mFc Y290T	pBF19 and pBF20	1,7
CD94-mFc NKG2A-mFc	pBF5 and pBF6	0,88
CD94-mFc E239K, K292D NKG2A-mFc D282K, K332E	pBF21 and pBF22	0,08

[0194] Para averiguar que las proteínas purificadas fueron de combinaciones de ambos NKG2A y CD94, una transferencia western se hizo, donde los dos anticuerpos Z199 y HP-3D9 (contra CD94 y NKG2A respectivamente) fueron usados. Los anticuerpos fueron marcados con tintes de fluorescencia, haciendo posible usar ambos anticuerpos en una única transferencia (figuras 13A y B). De las dos detecciones diferentes de la transferencia, fue evidente que la expresión de líneas celulares CD94-mFc solo produjeron esta proteína. Ninguna proteína podría ser observada donde el homodímero NKG2A debería estar, mostrando que esta proteína no produce homodímeros. En todas las otras columnas, bandas podrían ser observadas correspondientes a la presencia de ambos NKG2A y CD94, mostrando que heterodímeros reales han sido producidos.

[0195] Una línea de célula CHO estable (CHO-DUKX B11) expresando las construcciones CD94-2xGGs-NKG2A-mFc monocatenarias fue usada para producir proteína para análisis Biacore. 215 ml de sobrenadante de cultivo celular fue purificado en la columna de proteína A y tampón cambiado en PBS. La proteína resultante fue analizada por 1-D SDS PAGE y transferencia western que usa los dos anticuerpos Z199 y HP-3D9 marcados con tintes de fluorescencia (figuras 14A y B). El gel 1-D al igual que la transferencia western mostró que la proteína monocatenaria apareció como un dímero y respuestas dadas para ambos anticuerpos anti-CD94 y anti-NKG2A.

Ejemplo 9: Construcción de plásmido NKG2A para la expresión en *E. coli*

[0196] NKG2A fue subclonado BamHI bglII i BamHI + defosforilado (usando fosfatasa de intestino de ternero) en Trx-hexaHis pET32a para producir pSNN415, codificando la secuencia siguiente (SEC ID n°: 54) (figura 15):

```
MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLN      60
IDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHMHHH    120
HHSSGLVPRGSGMKETAATAKFERQHMDSPLDGTDDDDKAMADIGSQRHNSSLNTRTQKA    180
RHCGHCPEEWITYSNSCYIYGKERRTWEESLLACTSKNSSLLSIDNEEEMKFLSIIPSS      240
WIGVFRNSSHHPVWTMNGLAFKHEIKDSDNAELNCAVLQVNRLKSAQCGSSIIYHCKHKL    300
**                                                                    302
```

Ejemplo 10: Expresión de dominio extracelular NKG2A en *E. coli*

[0197] El dominio extracelular NKG2A humano (residuos 99-233 de SEC ID n°: 1) fue expresado en *E. coli*. NKG2A fue fundido N-terminalmente a tiorredoxina (Trx) y etiqueta hexaHis. El peso molecular previsto fue 33 kDa. Trx y hexaHis pueden quitados proteolíticamente usando enteropeptidasa. Trx-NKG2A fue expresado a aproximadamente 10 mg/L en 500 mL de cultivos a escala de laboratorio (Figura 16).

Ejemplo 11: Construcción de plásmido CD94 para la expresión en *E. coli*

[0198] CD94 fue subclonado BamHI bglII en el BamHI + defosforilado (usando fosfatasa de intestino de ternero) hexaHis- GST XPNNB pET15b para producir pSNN427, codificando la secuencia siguiente (SEC ID n°: 55) (figura 17):

```
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLESPILGWYKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEG      60
DKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGA      120
VLDIRYGVSR IAYS KDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDA  180
LDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPK    240

SDLVPRGSSFTKLSIEPAFTPGPNIELQKSDCCSCQEKWVGYRCNCYFISSEQKTWNES    300
RHLCASQKSSLLQLQNTDELDFMSSSQFYWIGLSYSEEHTAWLWENGSAQSQYLFPSFE    360
TFNTKNCIAYNPNGNALDESCEDKNRYICKQQLI**                               396
```

Ejemplo 12: Expresión de dominio extracelular CD94 en *E. coli*

[0199] El dominio extracelular CD94 humano (residuos 34-179 de SEC ID n°: 2) fue expresado en *E. coli*. CD94 fue fundido N-terminalmente a hexaHis y glutationa-S-transferasa (GST). El peso molecular previsto fue 46 kDa. HexaHis-GST se puede quitar por escisión con trombina. El nivel de expresión de GST-CD94 fue aproximadamente 50 mg/L en 500 mL de cultivos da escala de laboratorio. Expresión se obtuvo a 30°C. Las proteínas de fusión fueron expresadas en una forma insoluble. Varios métodos de lisis fueron seleccionados en este experimento particular (ciclos de congelar-descongelar (fz) usando TEN (tris, EDTA, NaCl), o lisis a base de detergente usando BugBuster (Novagen) o PopCulture (Novagen)) (Figura 18).

Ejemplo 13: Clonación de construcciones de expresión NKG2A-CD94 o CD94-NKG2A monocatenarias; dos estrategias

[0200] Los cebadores usados fueron:

```
2 x GGS - arriba: AGCTTGCGGGTAGCGGCGGGTAGCA (SEC ID n°: 56)
2 x GGS abajo: GATCTGCTACCGCCGCTACCGCCA (SEC ID n°: 57)
2 x GGS inserción abajo: GTTGTGCCTCTGGCTACCGCCGCTACCGCCAATGAGCTGTTGC (SEC ID n°: 58)
```

[0201] NKG2A-2xGGs-CD94. Primero, el NKG2A 3' final fue alterado en pBluescript-SK(-). Los oligos anillados (' 2xGGs - arriba' y ' 2xGGs abajo') al mismo tiempo se añadió un enlazador hidrofílico y se quitó codones de terminación

del clon original fue clonado HindIII bglII en NKG2A-pBluescript-SK(-) (pISNN425) (Figura 19A). Segundo, CD94 fue insertado BamHI-NotI en el enlazador NKG2A-2xGGG pBluescript-SK(-) NotI de BglII restringido (Figura 19B). Clones correctos fueron identificados por restricción de digestión y secuenciación usando de T7 y T3 cebadores.

5 [0202] NKG2A-2xGGG-CD94 (NKG2A-2xGGG-CD94-pBluescript-SK(-)) fue subclonado BglII de BamHI en el BamHI restringido y + defosforilado (usando fosfatasa de intestino de ternero) hexaHis-GST XPNNB pET15b o BglII de BamHI i BamHI + defosforilado Trx-hexaHis pET32a (Figura 20).

10 [0203] CD94-2xGGG-NKG2A. En otro método, CD94 está insertado BamHI-BglII en BamHI restringido y defosforilado NKG2A pBluescript-SK(-) (pISNN425). Un enlazador (2 x GGS inserción abajo) que al mismo tiempo retira un codón de terminación y añade un enlazador hidrofílico se inserta por mutagénesis dirigida. El cebador es 5- fosforilado y el 'kit Quick-change multi site-directed mutagenesis' (comprado de Stratagene) se usa. T7 y T3 cebadores se usan para verificación de secuencia. Heterodímeros CD94-2xGGG-NKG2A son subclonados BamHI-BglII i BamHI + defosforilado hexaHisGST XPNNB pET15b og BglII de BamHI i BamHI + defosforilado Trx-hexaHis pET32a. Ver figuras las 21 y 22.

15

[0204] Las construcciones son expresadas en BL21 (DE3).

[0205] La secuencia de aminoácidos para hexaHis-GST NKG2A-2xGGG-CD94 es (SEC ID n°: 37):

```

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLESPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEG 60
DKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGA 120
VLDIRYGVSRISYKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDA 180
LDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPK 240
SDLVPRGSQRHNNSSLNTRTQKARHCGHCPEEWITYNSCYIYIGKERRTWEESELLACTSK 300
NSSLLSIDNEEEMKFLSIISPSWIGVFRNSSHHPWVTMNGLAFLKHEIKSDNAELNCAV 360
LQVNRLKSAQCGSSIIYHCKHKLGGSGGSRSSFTKLSIEPAFTPGPNIELQKDSDCSCSQ 420
EKWVGYRCNCYFISSEQKTWNESRHLCASQKSSLLQLQNTDELDFMSSSQQFYWIGLSYS 480
EEHTAWLWENGSAALSQYLFPSFETFNTKNCIAYNPNGNALDESCEDKNRYICKQQLI** 539
    
```

20

[0206] La secuencia de aminoácidos para x-hexaHis-NKG2A-2xGGG-CD94 es (SEC ID n°: 38):

```

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLN 60
IDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVVALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHMHHH 120
HHSSGLVPRGSGMKETAALKFERQHMDSPDLGTDKAMADIGSQRHNNSSLNTRTQKA 180
RHCCHCPEEWITYNSCYIYIGKERRTWEESELLACTSKNSSLLSIDNEEEMKFLSIISPS 240
WIGVFRNSSHHPWVTMNGLAFLKHEIKSDNAELNCAVLQVNRLKSAQCGSSIIYHCKHKL 300
GGSGGSRSSFTKLSIEPAFTPGPNIELQKDSDCSCSQEKWVGYRCNCYFISSEQKTWNES 360
RHLCASQKSSLLQLQNTDELDFMSSSQQFYWIGLSYSEEHTAWLWENGSAALSQYLFPSFE 420
TFNTKNCIAYNPNGNALDESCEDKNRYICKQQLI** 456
    
```

25

Ejemplo 14: Expresión de NKG2A-2xGGG-CD94 en *E. coli*

[0207] Partes extracelulares NKG2A humano (residuos 99-233 de SEC ID NO:1) y CD94 humano (residuos 34-179 de SEC ID NO:2), separadas por un enlazador Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser, fueron expresadas como una fusión monocatenaria en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Dos construcciones de fusión NKG2A-CD94 diferentes fueron expresadas llevando respectivamente tiorredoxina (Trx) y etiqueta hexaHis o hexaHis y glutationa-S-transferasa (GST) en sus N-terminales. Trx-hexaHis-NKG2A-2xGGG-CD94 fue expresado a aproximadamente 100 mg/L en 500 mL de cultivos a escala de laboratorio. El nivel de expresión de hexaHis-GST-NKG2A- 2xGGG-CD94 fue aproximadamente 70 mg/L en 500 mL de cultivos a escala de laboratorio. Trx-hexaHis puede ser quitado proteolíticamente usando enteropeptidasa, hexaHis-GST se puede quitar por escisión con trombina. Expresión se obtuvo a 37°C. Las proteínas de fusión fueron expresadas altamente en las fracciones de granulato insolubles (p) (Figura 23).

35

Ejemplo 15: Expresión de construcciones monocatenarias TRX-His-tag-NKG2A-GGSGGS-CD94 en *E. coli*

[0208] Células aisladas de 250 ml de fermentación fueron lavadas una vez con 50 mM de Tris pH 8, 200 mM de NaCl, 5 mM de EDTA. El granulato obtenido fue resuspendido en 50 mM de Tris pH 8, 200 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 10 p/v% de sacarosa, 5 mM de DTT, 5 mM de benzamidina y lisado en una prensa francesa. Los cuerpos de inclusión insolubles fueron recogidos por centrifugado, lavados y disueltos en 6M de guanidino-hidrocloruro, 100 mM de Tris pH 8, 40 mM de DTT.

45

[0209] La proteína solubilizada fue diluida en 20 ml de tampón de replegamiento 50 mM de Tris pH 8,2, 750 mM de arginina, 10 mM de NaCl, 0,5 mM de KCl, 0,5 g/L de PEG3350, 2mM de MgCl₂, 2mM de CaCl₂, 4 mM de cistina, 1,5 mM de DTT. La mezcla de replegamiento se dejó a 5°C durante la noche.

5 [0210] La proteína replegada fue diluida 5 veces con 10 mM de Tris pH 8 y purificada por aplicación a un 5 ml columna de flujo rápido de Q sefarosa. Después de lavado con 2 Cv 10 mM de Tris pH 8, 50 mM de NaCl, la proteína fue eluida por un gradiente lineal sobre 10 CV a 10 mM de Tris pH 8, 2 M de NaCl.

Ejemplo 16: TRX-His-tag-NKG2A-GSGGS-CD94

10

[0211] Las células aisladas de 1 L de fermentación fueron lavadas una vez con 50 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA. El granulado obtenido fue resuspendido en 50 mM de Tris pH 8, 200 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 10 p/v% de sacarosa, 5 mM de DTT, 5 mM de benzamidina y lisado en una prensa francesa. Los cuerpos de inclusión insolubles fueron recogidos por centrifugado, lavados y disueltos en 6M de clorhidrato de guanidina, 100 mM de Tris pH 8, 40 mM de DTT.

15

[0212] La proteína solubilizada fue diluida en 100 ml de tampón de replegamiento 50 mM de Tris pH 8,2, 750 mM de arginina, 10 mM de NaCl, 0,5 mM de KCl, 0,5 g/L de PEG3350, 2mM de MgCl₂, 2mM de CaCl₂, 4 mM de cistina, 1,5 mM de DTT. La mezcla de replegamiento se dejó a 5 ° C durante la noche.

20

[0213] La proteína replegada fue diluida 5 veces con 10 mM de Tris pH 8 y purificada por aplicación a un 5 ml de columna de flujo rápido de Q sefarosa. Después de lavado con 2 Cv 10 mM de Tris pH 8, 50 mM de NaCl, la proteína fue eluida por un gradiente lineal sobre 10 CV a 10 mM de Tris pH 8, 2 M de NaCl.

25

Ejemplo 17: His-tag-GST-NKG2a-GSGGS-CD94

[0214] Células aisladas de 1 L de fermentación se lavan una vez con 50 mM de Tris pH 8, 200 mM de NaCl, 5 mM de EDTA. El granulado obtenido se resuspende en 50 mM de Tris pH 8, 200 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 10 p/v% de sacarosa, 5 mM de DTT, 5 mM de benzamidina y lisado en una prensa francesa. Los cuerpos de inclusión insolubles son recogidos por centrifugado, lavados y disueltos en 6M de clorhidrato de guanidina, 100 mM de Tris pH 8, 40 mM de DTT.

30

[0215] La proteína solubilizada se diluye en 20 ml de tampón de replegamiento 50 mM de Tris pH 8,2, 750 de mM arginina, 10 mM de NaCl, 0,5 mM de KCl, 0,5 g/L de PEG3350, 2mM de MgCl₂, 2mM de CaCl₂, 4 mM de cistina, 1,5 mM de DTT. La mezcla de replegamiento se deja a 5°C durante la noche.

35

[0216] La proteína replegada es diluida 5 veces con 10 mM de Tris pH 8 y se purifica por aplicación a una columna de flujo rápido de Q sefarosa 5 ml. Después de lavado con 2 Cv 10 mM de Tris pH 8, 50 mM de NaCl, la proteína se eluye por un gradiente lineal sobre 10 CV a 10 mM de Tris pH 8, 2 M de NaCl.

40

Ejemplo 18: Caracterización de construcciones CD94/NKG2A recombinantes por análisis de resonancia de plasmón de superficie

[0217] Las siguientes construcciones fueron analizadas para unión a los anticuerpos inmovilizados HP-3D9; Z199 y anti-ratón de conejo (RaM), con unión posterior a tetrámero HLA-E:

45

- Homo dímero CD94-mFc
- Monocatenario CD94-NKG2A-mFc
- Homo dímero NKG2A-mFc
- 50 Heterodímero CD94-mFc/NKG2A con mutación única
- Heterodímero CD94-mFc/NKG2A
- Heterodímero CD94-mFc/NKG2A con mutación doble.

Materiales

55

[0218] Estudios de resonancia de plasmón de superficie fueron realizados en un instrumento Biacore3000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Inmovilización de ligandos fueron realizados en un chip de sensor CM5 (Biacore AB), usando un equipo de acoplamiento de amina estándar como se describe por la producción (Biacore AB).

60

[0219] Tampón HBS-EP (10 mM de HEPES, 150mM de NaCl, 3mM de EDTA, 0,005% d Polisorbato 20 (v/v)) fue usado como tampón de desplazamiento y para todas las diluciones. Regeneración del chip de sensor fue realizado por una pulsación corta (15 ul, flujo 30 ul/min) de 10 mM de glicina-HCl pH 1,8.

65

[0220] Todos los experimentos fueron realizados a velocidad de flujo 10 ul/min. a 25°C. Los datos fueron analizados usando el software Biaevaluation 4.1.

[0221] Anticuerpo anti-CD94 HP-3D9 monoclonal (BD Pharmingen, cat# 555887), anticuerpo anti-CD94/NKG2A Z199 monoclonal (Immunotech, Francia) y anticuerpo anti-ratón de conejo (RaM) policlonal (Biacore AB), fueron inmovilizados por acoplamiento de amina a un nivel de ~5000 RU en las células de flujo individuales en un chip de sensor CM5.

5 *Unión de construcciones CD94/NKG2A a anticuerpos anti-CD94 y anti-CD94/NKG2A monoclonales y competición en la unión de tetrámero HLA-E*

10 [0222] Todas las construcciones fueron diluidas a 1 ug/ml en HBS-EP. Tetrámero HLA-E fue evaluado en 5 ug/ml conc. Cada ciclo consistió en inyección inicial de una construcción dado, seguido de inyección de tetrámero HLA-E. Construcción y tetrámero HLA-E fueron inyectados durante 3 min., cada uno seguido de una fase de 2.5 min. de disociación, antes de regeneración de la superficie del chip de sensor.

[0223] Todas las construcciones fueron evaluadas mientras se almacenaron a 4°C y a -20°C.

15 [0224] Todas las construcciones, excepto homodímero NKG2A-mFc, demostraron unión a HP-3D9 inmovilizado. Unión de las construcciones individuales a HP-3D9 pareció no ser afectada por las condiciones de almacenamiento, salvo el heterodímero CD94 mFc/NKG2A con construcción de mutación única, donde una reducción aparente en la constante de asociación podría ser detectada para la construcción almacenada a -20°C. No obstante la construcción se unió inmovilizada HP-3D9.

20 [0225] La constante de disociación aparente del heterodímero CD94-mFc/NKG2A con construcción de mutación doble fue más alta en comparación con las otras construcciones que demostraron modelos de disociación idénticos aparentes. Todas las construcciones, excepto el heterodímero CD94-mFc/NKG2A con mutación doble, demostraron unión estable durante la fase de 2,5 min. de disociación.

25 [0226] Ninguna unión de tetrámero HLA-E a cualquiera de las construcciones individuales en el complejo con HP-3D9 fue detectada.

30 [0227] Unión a Z199 inmovilizado fue observada para el CD94-NKG2A-mFc monocatenario, heterodímero CD94-mFc/NKG2A y heterodímero CD94-mFc/NKG2A con construcciones de mutación doble sin tener en cuenta las condiciones de almacenamiento. También, unión del heterodímero CD94-mFc/NKG2A con construcción de mutación única almacenada a 4°C fue detectada, mientras la misma construcción almacenada a -20°C no demostró ninguna unión. Aunque unión del heterodímero CD94-mFc/NKG2A y heterodímero CD94-mFc/NKG2A con construcciones de mutación única fue detectada, su asociación a inmovilizado Z199 pareció reducida en comparación con aquel del CD94-NKG2A-mFc monocatenario y heterodímero CD94-mFc/NKG2A con construcciones de mutación doble.

35 [0228] Mientras la unión del CD94-NKG2A-mFc monocatenario, heterodímero CD94-mFc/NKG2A y heterodímero CD94-mFc/NKG2A con mutación única (4°C almacenamiento) parece estable durante la fase de 2,5 min. de disociación, disociación de heterodímero CD94-mFc/NKG2A con mutación doble fue suficientemente rápida.

40 [0229] Unión de tetrámero HLA-E a una construcción en complejo con Z199, fue detectada para la construcción CD94-NKG2A-mFc monocatenaria. La unión de tetrámero HLA-E pareció estable durante el periodo de 2,5 min. de disociación.

45 [0230] Todas las construcciones, excepto homo dímero NKG2A-mFc, se unieron con RaM inmovilizado. Nuevamente, la asociación del heterodímero CD94-mFc/NKG2A con construcción de mutación única almacenada a -20°C pareció reducida en comparación con la mismo construcción almacenada a 4°C.

50 [0231] Unión de tetrámero HLA-E a complejos entre RaM y las construcciones individuales se observó para todas las construcciones, salvo el homodímero NKG2A-mFc. Las cantidades más altas relativas de tetrámero HLA-E unido, fueron detectadas para el CD94-NKG2A-mFc monocatenario y heterodímero CD94-mFc/NKG2A con complejos de mutación doble.

55 **Ejemplo 19: Unión de TRX-His-tag-NKG2a-GSS-GSS-CD94-His-Tag/pET32a a anticuerpos anti-CD94 y anti-CD94/NKG2A monoclonales**

60 [0232] THX-His-tag-NKG2a-GSS-GSS-CD94-His-Tag/pET32a expresado en *E.Coli* fue analizado para unión a anticuerpos HP-3D9 y Z199 monoclonales inmovilizados (véase ejemplo 18). Dos preparaciones diferentes preparadas a pH 6,0, 7,0 y 8,0 respectivamente, fueron evaluadas; una obtenida de un 250 ml de fermentación (B3), y un de un 1 L de fermentación (B12) (ver ejemplos 15 y 16).

[0233] Las preparaciones a partir de 250 ml de fermentación fueron evaluadas en dilución 1:10 en HBS-EP, e inyectadas durante 3 min., seguido de 2,5 min. de disociación. Las preparaciones unidas a ambos HP-3D9 inmovilizado y Z199 inmovilizado, con cantidades más altas unidas a HP-3D9 inmovilizado (Figura 24).

65

[0234] Las preparaciones a partir de 1L de fermentación fueron diluidas a 10 ug/ml e inyectadas durante 3 min., seguido de 2,5 min. de disociación. Esta unión también demostró unión a ambos HP-3D9 y Z199 inmovilizados (Figura 24).

Ejemplo 20: Diseño y producción de construcciones de expresión mFc-hNKG2C-hCD94

[0235] NKG2C soluble humano fue ordenado de Geneart, Regensburg, Alemania. La secuencia fue ordenada con un 5' sitio de restricción de BamHI y un 3' sitio de restricción HindIII para fácilmente reemplazar hNKG2A de pBF17 dando como resultado pBF74 (NKG2C/CD94-Fc) (SEC ID n°: 59):

```

1  MPLLLLLPLL WAGALAMDVP RDCGCKPCIC TVPEVSSVFI FPPKPKDVL
51  ITLTPKVTCV VVDISKDDPE VQFSWFVDDV EVHTAQTKPR EEQFNSTFRS
101 VSELPIMHQD WLNGKEFKCR VNSAAFPAPI EKTISKTKGR PKAPQVYTIP
151 PPKEQMAKDK VSLTCMITDF FPEDITVEWQ WNGQPAENYK NTQPIMDTDG
201 SYFVYSKLVN QKSNWEAGNT FTCSVLHEGL HNHHTKSL S HSPGKGSFLE
251 QNNSSPNTRT QKARHCGHCP EEWITYNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK
301 NSSLLSIDNE EEMKFLASIL PSSWIGVFRN SSHHPWVTIN GLAFKHKIKD
351 SDNAELNCAV LQVNRKLSAQ CGSSMIYHCK HKLGGSGGSR SSFTKLSIEP
401 AFTPGPNIEL QKSDSCCSCQ EKWVGYRCNC YFISSEQKTW NESRHLCASQ

451 KSSLLQLQNT DELDFMSSSQ QFYWIGLSYS EEHTAWLWEN GSALSQYLF
501 SFETFNTKNC IAYNPNGNAL DESCEDKNRY ICKQQLI
    
```

[0236] La construcción comprende el péptido de señal CD33 (SEC ID n°: 30), una porción Fc 227 (Bisagra-CH2-CH3) (SEC ID n°: 21), enlazador (GS), residuos 96-231 de hNKG2C (SEC ID n°: 3), un separador GSGGSR y residuos 34 a 180 de hCD94 (SEC ID n°: 2).

Construcciones de porción NKG2A mutadas para expresión de célula mamífera

[0237] Las secuencias de aminoácidos de las partes solubles de NKG2C y NKG2A usadas en las construcciones monocatenarias solo difieren en los residuos 99, 100, 101, 106, 167, 168, 170, 189 y 197, usando la numeración del alineamiento en la figura 25. Note que las secuencias usadas en las construcciones monocatenarias comienza en la posición 98 para NKG2C (FLEQ) y a 99 para NKG2A (QRH) según el esquema de numeración anterior.

[0238] Una serie construcciones CD94/NKG2C monocatenarias fueron desarrolladas basadas en la construcción monocatenaria (Sig)- (mFc)-GS-(NKG2A)-GGG-GGS-RSS-(CD94) (SEC ID n°: 39). Esta construcción comprende residuos 34 a 180 de hCD94 (SEC ID n°: 2), residuos 99-233 de hNKG2A (SEC ID n°:1), un separador GSGGSR entre las partes NKG2A y CD94, y una porción Fc 227. La serie fue preparada con mutaciones reiterativas catalogadas en la tabla 4 de abajo:

Tabla 4

Mutaciones reiterativas para convertir ssCD94/NKG2A a construcción ssCD94/NKG2C	
Mut1	Q99L, R100E, H101Q, L106P
Mut2	S167A, I168S, S170L
Mut3	M189I
Mut4	E197K
Mut5	I225M

[0239] Mutaciones en la parte hNKG2A fueron conseguidas usando mutagénesis de quikchange en la construcción pBF17(SEQ identidad NO:39). Los cebadores usados en la mutagénesis quikchange fueron:

Mut1 LEQ-P; directo (SEC ID n°: 60), inverso (SEC ID n°: 61)
 Mut2 AS-L; directo (SEC ID n°: 62), inverso (SEC ID n°: 63)
 Mut3 I; directo (SEC ID n°: 64), inverso (SEC ID n°: 65)
 Mut4 K; directo (SEC ID n°: 66), inverso (SEC ID n°: 67)
 Mut5 M; directo (SEC ID n°: 68); inverso (SEC ID n°: 69)

[0240] Estas mutaciones fueron llevadas a cabo usando kit de mutagénesis dirigida Quikchange II y manual de Stratagene #200523: Un único paso de desnaturalización 95°C/30 seg fue seguido de 15 ciclos como dado: 95°C/30 seg; 55°C/1 min; 68°C/7 min., finalizando con 72°C/10 min.

5 **Ejemplo 21: Estudio SPR de unión de anticuerpos anti-NKG2A o -NKG2C a proteínas recombinantes scCD94/NKG2C o scCD94/NKG2A**

Materiales y métodos

10 [0241] Mediciones de resonancia de plasmón de superficie (SPR) fueron realizadas en un aparato Biacore T100 (Biacore GE Healthcare) a 25°C. En todos los experimentos Biacore HBS-EP+ tampón (Biacore GE Healthcare) sirvió como tampón de desplazamiento y sensogramas fueron analizados con softwares de evaluación de Biaevaluation 4.1 y Biacore T100. Los anticuerpos usados fueron anti-NKG2A (humZ270 y Z199), anti-NKG2C (Immunotech-Beckman Coulter), y anti-NKG2D (ON72).

15

Inmovilización de proteína

20 [0242] Proteínas recombinantes fueron inmovilizadas de manera covalente a grupos carboxilo en el estrato de dextrano en un Sensor Chip CM5 (chip). La superficie del chip fue activada con EDC/NHS (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidehidrocloruro y N-hidroxisuccinimida (Biacore GE Healthcare)). Proteínas fueron diluidas a 10 µg/ml en el tampón de acoplamiento (10 mM de acetato, pH 5,6) e inyectadas hasta que el nivel de inmovilización apropiado fue alcanzado (es decir, 700, 630 y 400 RU durante 2A, 2C y 2D respectivamente).

25 [0243] Desactivación de los grupos activados fue realizada usando 100 mM de etanolamina pH 8 (Biacore GE Healthcare).

Estudio de unión

30 [0244] Para experimentos de unión simples, anticuerpos fueron inyectados a una concentración constante de 10 µg/ml durante 1 minuto a una velocidad de flujo de 10 µl/min sobre los chips de proteína recombinantes scCD94/NKG2A, scCD94/NKG2C y NKG2D-Fc. Después de cada ciclo, los chips fueron regenerados por una inyección de ocho segundos de tampón 500 mM de NaCl y 10 mM de NaOH a velocidad de flujo de 40 µl/min. Para cada de anticuerpo, los sensogramas obtenidos en los chips de proteína diferentes fueron superpuestos y normalizados a un valor arbitrario de 100 RU para el eje Y.

35

Medición de afinidad

40 [0245] Para experimentos cinéticos, diluciones en serie de 0,078 a 5 nanoM de anticuerpos solubles fueron inyectados durante 2 min a una velocidad de flujo constante de 40 µl/min en los estratos de dextrano con proteínas inmovilizadas scCD94/NKG2A recombinantes y se les permitió disociarse durante 3 min antes de regeneración por una inyección de ocho segundos de tampón 500 mM de NaCl y 10 mM de NaOH.

[0246] Los sensogramas resultantes fueron analizados por ajuste global que usa el modelo Langmuir apropiado.

45 *Inhibición de unión de tetrámeros HLA-E*

[0247] Para experimentos de inhibición, anticuerpos fueron inyectados a una concentración constante de 10 µg/ml en los estratos de dextrano con proteínas objetivo inmovilizadas scCD94/NKG2A recombinantes. Cada ciclo de competición consistió en tres pasos de inyección de 2 min a una velocidad de flujo constante de 10 µl/min. En primer lugar, el anticuerpo es inyectado dos veces. En segundo lugar, sin eliminación el anticuerpo unido, el tetrámero HLA-E a 8 µg/ml se inyecta y sensogramas y RU valores son monitoreados. Las señales de unión del tetrámero HLA-E en presencia de anticuerpos son en comparación con aquellos obtenidos cuando el tetrámero HLA-E se inyecta directamente en proteínas scCD94/NKG2A desnudas recombinantes. El porcentaje de inhibición (I%) fue determinado de valores RU obtenidos 10 segundos después del final de inyecciones, usando la siguiente fórmula: $I\% = (1 - (RU + Ab / RUNuno)) * 100$. RU+Ab y RUNuno son valores RU de unión HLA-E monitoreados respectivamente en presencia y en ausencia de un anticuerpo. Los sensogramas correspondientes a inyección HLA-E (tercer paso) fueron alineados a cero en la inyección salen para ambos eje X e Y y superpuestos.

60 [0248] Después de cada ciclo, los chips fueron regenerados por una inyección de ocho segundos de tampón 500 mM de NaCl y 10 mM de NaOH a velocidad de flujo de 40 µl/min.

Resultados

65 [0249] La unión de anticuerpos humZ270 y humZ199 a proteínas NKG2A, NKG2C y NKG2D recombinantes fue analizado por SPR (Figura 26). Ambos anticuerpos unidos al chip scCD94/NKG2A mientras que no se unen al chip scCD94/NKG2C. Proteínas NKG2D-Fc fueron usadas como control negativo.

[0250] El chip scCD94/NKG2C fue controlado usando anti-NKG2C-PE (FAB138P, R&D Systems), inyectado a 2,5 µg/ml durante 1 min sobre el chip NKG2C. Este anticuerpo se une bien a NKG2C nativo expresado en la superficie celular. El anticuerpo unido al chip scCD94/NKG2C, indica la presencia de proteínas inmovilizadas en un estado apropiado que imita la situación de superficie celular. El chip NKG2D-Fc fue controlado usando anticuerpos humON72.

[0251] Para analizar las propiedades aglutinantes de HLA-E, la unión de tetrámeros HLA-E a chips scCD94/NKG2A fue monitoreada en ausencia y en presencia de humZ270. La saturación de chips scCD94/NKG2A usando anticuerpos humZ270 inhibe completamente la unión de tetrámeros HLA-E (IZ270 = 81,8 %).

Aspectos ilustrativos:

[0252]

1. Un receptor monocatenario soluble CD94/NKG2 comprendiendo una parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 y una parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94.
2. La construcción monocatenaria de la forma de realización 1, comprendiendo además un polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo todo o parte de un dominio Fc o variante de este.
3. El receptor monocatenario soluble CD94/NKG2 de la forma de realización 2, donde el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se une al N-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2, y el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 se une al polipéptido de inmunoglobulina.
4. El receptor monocatenario soluble CD94/NKG2 de la forma de realización 2, donde el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 se une al N-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, y el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se une al polipéptido de inmunoglobulina.
5. El receptor monocatenario soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 3 y 4, donde la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 y la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se unen por un enlazador peptídico comprendiendo glicina y serina.
6. Un dímero del receptor monocatenario soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización precedentes.
7. Un receptor soluble CD94/NKG2 comprendiendo una subunidad NKG2 comprendiendo una parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 y una subunidad CD94 comprendiendo una parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, donde al menos una de la subunidad NKG2 y subunidad CD94 comprende un polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo todo o parte de un dominio Fc o variante de este.
8. El receptor soluble CD94/NKG2 de la forma de realización 7, donde el polipéptido de inmunoglobulina comprende una parte de un dominio Fc IgG que aumenta la vida media *in vivo* de la construcción.
9. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 7-8, donde el polipéptido de inmunoglobulina es un dominio Fc funcional.
10. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 7-9, donde el dominio Fc es de un anticuerpo IgG4.
11. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 7-10, donde el dominio Fc es de un anticuerpo IgG1.
12. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 7-11, donde solo una de las subunidades CD94 y NKG2A comprende un polipéptido de inmunoglobulina.
13. El receptor soluble CD94/NKG2 de la forma de realización 12, donde el polipéptido de inmunoglobulina se une a la parte C-terminal de la subunidad.
14. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 12-13, donde las subunidades CD94 y NKG2A son unidas vía un enlazador peptídico.
15. El receptor soluble CD94/NKG2 de la forma de realización 13, donde el enlazador peptídico comprende la secuencia GGSGGS (SEC ID NO:6).
16. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 12-15, donde la subunidad NKG2 es unida de manera covalente al polipéptido de inmunoglobulina.
17. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 12-15, donde la subunidad CD94 es unida de manera covalente al polipéptido de inmunoglobulina.
18. El receptor soluble CD94/NKG2 de la forma de realización 7, donde cada una de las subunidades CD94 y NKG2 es unida de manera covalente a un polipéptido de inmunoglobulina.
19. El receptor soluble CD94/NKG2 de la forma de realización 18, donde el N-terminal de la subunidad NKG2 se une al C-terminal de un primer polipéptido de inmunoglobulina para formar un primer polipéptido, y el N-terminal de la subunidad CD94 se une al C-terminal de un segundo polipéptido de inmunoglobulina para formar un segundo polipéptido.
20. El receptor soluble CD94/NKG2 de la forma de realización 19, donde el primer polipéptido de inmunoglobulina comprende una lisina en un residuo correspondiente al residuo 239 y un ácido aspártico en un residuo correspondiente a residuo 292 en un dominio Fc humano IgG1, y el segundo polipéptido de inmunoglobulina comprende una lisina en un residuo correspondiente a residuo 282 y un ácido aspártico en un residuo correspondiente a residuo 322 en un dominio Fc humano IgG1.

21. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 19 y 20, donde el primer polipéptido de inmunoglobulina comprende lisina en residuos correspondientes a los residuos 239 y 240 y un ácido aspártico en un residuo correspondiente al residuo 292 en un dominio Fc humano IgG1, y el segundo polipéptido de inmunoglobulina comprende un ácido glutámico en un residuo correspondiente al residuo 253, una lisina en un residuo correspondiente al residuo 282, y un ácido aspártico en un residuo correspondiente al residuo 322 en un dominio Fc humano IgG1.
22. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 20 y 21, donde los primeros y segundos polipéptidos de inmunoglobulina son variantes de un dominio Fc humano IgG1, el primer polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo sustituciones, correspondientes a K253E, D282K y K322D, y el segundo polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo sustituciones, correspondientes a D239K, E240K y K292D o viceversa.
23. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 20 y 21, donde los primeros y segundos polipéptidos de inmunoglobulina son variantes de un dominio Fc humano IgG4, el primer polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo sustituciones correspondientes a K250E, D279K y K319D, y el segundo polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo sustituciones, correspondientes a E236K, E237K, R289D, o viceversa.
24. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización precedentes, que es CD94/NKG2A.
25. El receptor soluble CD94/NKG2A de la forma de realización 25, donde la subunidad NKG2A comprende residuos 99-233 de la SEC ID n°: 1.
26. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 1-23, que es CD94/NKG2C.
27. El receptor soluble CD94/NKG2C de la forma de realización 26, donde la subunidad NKG2C comprende residuos 96- 231 de la SEC ID n°: 3.
28. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización precedentes, donde la secuencia de aminoácidos CD94 es la SEC ID n°: 2.
29. El receptor soluble CD94/NKG2A de la forma de realización 28, donde la subunidad CD94 comprende residuos 35-179 de la SEC ID n°: 2.
30. El receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización precedentes, donde el polipéptido de inmunoglobulina es unido de manera covalente a una secuencia señal.
31. Un receptor soluble CD94/NKG2A comprendiendo la secuencia de cualquiera de las SEC ID n°: 37-39.
32. Un receptor soluble CD94/NKG2C comprendiendo la secuencia de la SEC ID n°: 59.
33. Un ácido nucleico que codifica el receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización precedentes.
34. Una célula transformada con un vector de expresión comprendiendo el ácido nucleico de la forma de realización 33.
35. La célula de la forma de realización 34, que es una célula procariota o célula eucariota.
36. Un método para producir un receptor soluble CD94/NKG2, comprendiendo cultivo la célula de la forma de realización 35 bajo condiciones adecuadas para la expresión del receptor soluble CD94/NKG2.
37. Una composición farmacéutica comprendiendo una cantidad eficaz del receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 1 a 32 y un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente.
38. Un método para producir un anticuerpo contra un receptor CD94/NKG2, el método comprendiendo:
- Inoculación de un animal con un receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 1 a 32, donde el polipéptido suscita una respuesta inmunitaria en el animal para producir el anticuerpos; y
 - aislamiento del anticuerpo del animal.
39. Un método para detectar una molécula HLA-E, el método comprendiendo:
- contacto de una muestra biológica comprendiendo una célula de expresión HLA-E con un receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 1 a 32 y
 - detección de unión del receptor soluble CD94/NKG2 a la célula.
40. Un método para producir un compuesto de unión del antígeno anti-NKG2, el método comprendiendo:
- proporción de un compuesto de unión del antígeno que específicamente se une a un polipéptido NKG2;
 - prueba del compuesto de unión del antígeno para unión a un receptor soluble CD94/NKG2A de cualquiera de las formas de realización 1 a 32;
 - selección del compuesto de unión del antígeno si se determina que el compuesto de unión del antígeno se une al receptor soluble CD94/NKG2A; y
 - opcionalmente, producción de una cantidad del compuesto de unión del antígeno seleccionado.
41. Un método para producir un compuesto de unión del antígeno anti-NKG2, el método comprendiendo:
- producción de una cantidad de un compuesto de unión del antígeno que específicamente se une a un polipéptido NKG2;
 - prueba de una muestra de dicha cantidad de un compuesto de unión del antígeno para unión a un receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 1 a 32;
 - selección de la cantidad para uso como un medicamento y/o en la producción de un medicamento si se determina que el compuesto de unión del antígeno se une al receptor soluble CD94/NKG2; y
 - opcionalmente, preparación de la cantidad para administración a un humano, opcionalmente formulación de una cantidad del compuesto de unión del antígeno seleccionado con un portador farmacéuticamente aceptable.
42. Un método para producir un compuesto de unión del antígeno anti-NKG2, el método comprendiendo:
- proporción de una pluralidad de compuestos de unión del antígeno que específicamente se unen con un polipéptido NKG2,
 - prueba de cada uno de los compuestos de unión del antígeno para unión a un receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las formas de realización 1 a 32;
 - selección de un compuesto de unión del antígeno si se determina que el compuesto de unión del antígeno se une a dicho receptor soluble CD94/NKG2; y

- d. opcionalmente, hacer que el compuesto de unión del antígeno adecuado para administración humana; y/o
- e. opcionalmente, producción de una cantidad del compuesto de unión del antígeno seleccionado.

- 43. El método de cualquiera de las formas de realización 40 a 42, donde haciendo el humano de compuesto de unión del antígeno adecuado comprende hacer el compuesto de unión del antígeno humanizado o quimérico.
- 5 44. El método de cualquiera de las formas de realización 40-43, donde producción de una cantidad de compuesto de unión del antígeno comprende cultivo de una célula que expresa el compuesto de unión del antígeno en un medio adecuado y recuperación el compuesto de unión del antígeno.
- 45. El método de cualquiera de las formas de realización 40-44, donde el compuesto de unión del antígeno comprende un anticuerpo o un fragmento de unión del antígeno de este.
- 10 46. El método de cualquiera de las formas de realización 40-45, donde el compuesto de unión del antígeno es un anticuerpo.
- 47. El método de cualquiera de las formas de realización 40-46, donde el polipéptido NKG2 es NKG2A.
- 48. El método de cualquiera de las formas de realización 40-46, donde el polipéptido NKG2 es NKG2C.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

[0253]

- <110> Novo Nordisk A/S
- 20 <120> receptores solubles heterodiméricos y usos de los estos
- <130> 7382.000-EP
- 25 <160> 69
- <170> Versión de patentIn 3.3
- <210> 1
- <211> 233
- 30 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 385 754 T3

Met Asp Asn Gln Gly Val Ile Tyr Ser Asp Leu Asn Leu Pro Pro Asn
 1 5 10 15

Pro Lys Arg Gln Gln Arg Lys Pro Lys Gly Asn Lys Ser Ser Ile Leu
 20 25 30

Ala Thr Glu Gln Glu Ile Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Leu Gln Lys Ala
 35 40 45

Ser Gln Asp Phe Gln Gly Asn Asp Lys Thr Tyr His Cys Lys Asp Leu
 50 55 60

Pro Ser Ala Pro Glu Lys Leu Ile Val Gly Ile Leu Gly Ile Ile Cys
 65 70 75 80

Leu Ile Leu Met Ala Ser Val Val Thr Ile Val Val Ile Pro Ser Thr
 85 90 95

Leu Ile Gln Arg His Asn Asn Ser Ser Leu Asn Thr Arg Thr Gln Lys
 100 105 110

Ala Arg His Cys Gly His Cys Pro Glu Glu Trp Ile Thr Tyr Ser Asn
 115 120 125

Ser Cys Tyr Tyr Ile Gly Lys Glu Arg Arg Thr Trp Glu Glu Ser Leu
 130 135 140

Leu Ala Cys Thr Ser Lys Asn Ser Ser Leu Leu Ser Ile Asp Asn Glu
 145 150 155 160

Glu Glu Met Lys Phe Leu Ser Ile Ile Ser Pro Ser Ser Trp Ile Gly
 165 170 175

Val Phe Arg Asn Ser Ser His His Pro Trp Val Thr Met Asn Gly Leu
 180 185 190

Ala Phe Lys His Glu Ile Lys Asp Ser Asp Asn Ala Glu Leu Asn Cys
 195 200 205

Ala Val Leu Gln Val Asn Arg Leu Lys Ser Ala Gln Cys Gly Ser Ser
 210 215 220

Ile Ile Tyr His Cys Lys His Lys Leu
 225 230

<210> 2
 <211> 179
 <212> PRT

ES 2 385 754 T3

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Gly Ile Ile Cys Leu Ser Leu Met Ala Thr Leu Gly Ile Leu Leu Lys
20 25 30

Asn Ser Phe Thr Lys Leu Ser Ile Glu Pro Ala Phe Thr Pro Gly Pro
35 40 45

Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser Asp Cys Cys Ser Cys Gln Glu Lys
50 55 60

Trp Val Gly Tyr Arg Cys Asn Cys Tyr Phe Ile Ser Ser Glu Gln Lys
65 70 75 80

Thr Trp Asn Glu Ser Arg His Leu Cys Ala Ser Gln Lys Ser Ser Leu
85 90 95

Leu Gln Leu Gln Asn Thr Asp Glu Leu Asp Phe Met Ser Ser Ser Gln
100 105 110

Gln Phe Tyr Trp Ile Gly Leu Ser Tyr Ser Glu Glu His Thr Ala Trp
115 120 125

Leu Trp Glu Asn Gly Ser Ala Leu Ser Gln Tyr Leu Phe Pro Ser Phe
130 135 140

Glu Thr Phe Asn Thr Lys Asn Cys Ile Ala Tyr Asn Pro Asn Gly Asn
145 150 155 160

Ala Leu Asp Glu Ser Cys Glu Asp Lys Asn Arg Tyr Ile Cys Lys Gln
165 170 175

Gln Leu Ile

5

10

<210> 3
<211> 231
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 3

ES 2 385 754 T3

Met Ser Lys Gln Arg Gly Thr Phe Ser Glu Val Ser Leu Ala Gln Asp
 1 5 10 15

Pro Lys Arg Gln Gln Arg Lys Pro Lys Gly Asn Lys Ser Ser Ile Ser
 20 25 30

Gly Thr Glu Gln Glu Ile Phe Gln Val Glu Leu Asn Leu Gln Asn Pro
 35 40 45

Ser Leu Asn His Gln Gly Ile Asp Lys Ile Tyr Asp Cys Gln Gly Leu
 50 55 60

Leu Pro Pro Pro Glu Lys Leu Thr Ala Glu Val Leu Gly Ile Ile Cys
 65 70 75 80

Ile Val Leu Met Ala Thr Val Leu Lys Thr Ile Val Leu Ile Pro Phe
 85 90 95

Leu Glu Gln Asn Asn Ser Ser Pro Asn Thr Arg Thr Gln Lys Ala Arg
 100 105 110

His Cys Gly His Cys Pro Glu Glu Trp Ile Thr Tyr Ser Asn Ser Cys
 115 120 125

Tyr Tyr Ile Gly Lys Glu Arg Arg Thr Trp Glu Glu Ser Leu Leu Ala
 130 135 140

Cys Thr Ser Lys Asn Ser Ser Leu Leu Ser Ile Asp Asn Glu Glu Glu
 145 150 155 160

Met Lys Phe Leu Ala Ser Ile Leu Pro Ser Ser Trp Ile Gly Val Phe
 165 170 175

Arg Asn Ser Ser His His Pro Trp Val Thr Ile Asn Gly Leu Ala Phe
 180 185 190

Lys His Lys Ile Lys Asp Ser Asp Asn Ala Glu Leu Asn Cys Ala Val
 195 200 205

Leu Gln Val Asn Arg Leu Lys Ser Ala Gln Cys Gly Ser Ser Met Ile
 210 215 220

Tyr His Cys Lys His Lys Leu
 225 230

5 <210> 4
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 4

ES 2 385 754 T3

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

Pro Lys Pro Gln Gln Arg Lys Pro Lys Gly Asn Lys Ser Ser Ile Ser
 20 25 30

Gly Thr Glu Gln Glu Ile Phe Gln Val Glu Leu Asn Leu Gln Asn Ala
 35 40 45

Ser Leu Asn His Gln Gly Ile Asp Lys Ile Tyr Asp Cys Gln Gly Leu
 50 55 60

Leu Pro Pro Pro Glu Lys Leu Thr Ala Glu Val Leu Gly Ile Ile Cys
 65 70 75 80

Ile Val Leu Met Ala Thr Val Leu Lys Thr Ile Val Leu Ile Pro Phe
 85 90 95

Leu Glu Gln Asn Asn Ser Ser Pro Asn Thr Arg Thr Gln Lys Ala Arg
 100 105 110

Pro Cys Gly His Cys Pro Glu Glu Trp Ile Thr Tyr Ser Asn Ser Cys
 115 120 125

Tyr Tyr Ile Gly Lys Glu Arg Arg Thr Trp Glu Glu Ser Leu Gln Ala
 130 135 140

Cys Ala Ser Lys Asn Ser Ser Ser Leu Leu Ser Ile Asp Asn Glu Glu
 145 150 155 160

Glu Met Lys Phe Leu Ala Ser Ile Leu Pro Ser Ser Trp Ile Gly Val
 165 170 175

Phe Arg Asn Ser Ser His His Pro Trp Val Thr Ile Asn Gly Leu Ala
 180 185 190

Phe Lys His Glu Ile Lys Asp Ser Asp His Ala Glu Arg Asn Cys Ala
 195 200 205

Met Leu His Val Arg Gly Leu Ile Ser Asp Gln Cys Gly Ser Ser Arg
 210 215 220

Ile Ile Arg Arg Gly Phe Ile Met Leu Thr Arg Leu Val Leu Asn Ser
 225 230 235 240

5 <210> 5
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 385 754 T3

<400> 5

Met Asn Lys Gln Arg Gly Thr Tyr Ser Glu Val Ser Leu Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Pro Lys Arg Gln Gln Arg Lys Leu Lys Gly Asn Lys Ser Ser Ile Ser
 20 25 30
 Gly Thr Lys Gln Glu Ile Phe Gln Val Glu Leu Asn Leu Gln Asn Ala
 35 40 45
 Ser Ser Asp His Gln Gly Asn Asp Lys Thr Tyr His Cys Lys Gly Leu
 50 55 60
 Leu Pro Pro Pro Glu Lys Leu Thr Ala Glu Val Leu Gly Ile Ile Cys
 65 70 75 80
 Ile Val Leu Met Ala Thr Val Leu Lys Thr Ile Val Leu Ile Pro Cys
 85 90 95
 Ile Gly Val Leu Glu Gln Asn Ser Phe Ser Leu Asn Arg Arg Met Gln
 100 105 110
 Lys Ala Arg His Cys Gly His Cys Pro Glu Glu Trp Ile Thr Tyr Ser
 115 120 125
 Asn Ser Cys Tyr Tyr Ile Gly Lys Glu Arg Arg Thr Trp Glu Glu Arg
 130 135 140
 Val Cys Trp Pro Val Leu Arg Arg Thr Leu Ile Cys Phe Leu
 145 150 155

5

<210> 6

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> enlazador

15

<400> 6

Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5

20 <210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> enlazador

<400> 7

ES 2 385 754 T3

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Ser Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 330
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

10

ES 2 385 754 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

ES 2 385 754 T3

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

5 <210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

10 <210> 11
 <211> 105
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 11

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

20

ES 2 385 754 T3

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 12
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

5

<400> 12

Ala Glu Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala
 1 5 10 15

Leu Lys Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

Thr Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr

10

ES 2 385 754 T3

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

<210> 13
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 13

ES 2 385 754 T3

Thr Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Val Pro Gly Cys Ser Asp
 1 5 10 15
 Thr Ser Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe
 20 25 30
 Pro Glu Pro Val Thr Val Lys Trp Asn Tyr Gly Ala Leu Ser Ser Gly
 35 40 45
 Val Arg Thr Val Ser Ser Val Leu Gln Ser Gly Phe Tyr Ser Leu Ser
 50 55 60
 Ser Leu Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Ile
 65 70 75 80
 Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Glu Leu Ile Lys Arg Ile
 85 90 95
 Glu Pro Arg Ile Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Cys Pro
 100 105 110
 Pro Gly Asn Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 115 120 125
 Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
 130 135 140
 Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val His Val Ser Trp Phe
 145 150 155 160
 Val Asp Asn Lys Glu Val His Thr Ala Trp Thr Gln Pro Arg Glu Ala
 165 170 175
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His
 180 185 190

ES 2 385 754 T3

Gln Asp Trp Met Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys
 195 200 205

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Arg
 210 215 220

Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Arg Glu Gln Met
 225 230 235 240

Ser Lys Lys Lys Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Thr Asn Phe Phe Ser
 245 250 255

Glu Ala Ile Ser Val Glu Trp Glu Arg Asn Gly Glu Leu Glu Gln Asp
 260 265 270

Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Ile Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Leu
 275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Thr Asp Ser Trp Leu Gln Gly Glu Ile
 290 295 300

Phe Thr Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu His Asn His His Thr Gln
 305 310 315 320

Lys Asn Leu Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 14
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 14

5

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

10

ES 2 385 754 T3

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
165 170 175

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

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
195 200 205

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
210 215 220

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
245 250 255

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
260 265 270

Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
275 280 285

ES 2 385 754 T3

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
 290 295 300

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 325 330

<210> 15

<211> 335

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Val Pro Val Cys Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Asn Thr Trp Pro Ser Gln Thr Ile
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile Glu Pro Arg Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys Pro Pro His Gln
 100 105 110

Arg Val Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser
 130 135 140

10

Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp

ES 2 385 754 T3

Leu Lys Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

Thr Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Ser Ser Gln Ala Val
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile Val Pro Arg Glu Cys Asn Pro Cys Gly Cys Thr Gly Ser Glu Val
 100 105 110

Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Thr Lys Asp Val Leu Thr Ile
 115 120 125

Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asn
 130 135 140

Asp Pro Glu Val Arg Phe Ser Trp Phe Ile Asp Asp Val Glu Val His
 145 150 155 160

Thr Ala Gln Thr His Ala Pro Glu Lys Gln Ser Asn Ser Thr Leu Arg
 165 170 175

Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Val His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 180 185 190

Thr Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Gly Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu
 195 200 205

Lys Ser Ile Ser Lys Pro Glu Gly Thr Pro Arg Gly Pro Gln Val Tyr
 210 215 220

Thr Met Ala Pro Pro Lys Glu Glu Met Thr Gln Ser Gln Val Ser Ile
 225 230 235 240

ES 2 385 754 T3

Thr Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Thr Glu Trp
 245 250 255

Lys Met Asn Gly Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr
 260 265 270

Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys
 275 280 285

Lys Glu Thr Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His
 290 295 300

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 305 310 315 320

Gly Lys

<210> 17
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 17

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met
 50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val
 65 70 75 80

Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

10

ES 2 385 754 T3

Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
 130 135 140

Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
 145 150 155 160

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
 165 170 175

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val
 180 185 190

Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 195 200 205

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

Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu
 225 230 235 240

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

Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser
 260 265 270

Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp
 275 280 285

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser
 290 295 300

Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly
 305 310 315 320

Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 325 330 335

<210> 18

<211> 333

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 18

ES 2 385 754 T3

Ala Gln Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser
 35 40 45

Asp Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

Thr Ser Ser Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys
 65 70 75 80

Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 85 90 95

Arg Arg Asn Gly Gly Ile Gly His Lys Cys Pro Thr Cys Pro Thr Cys
 100 105 110

His Lys Cys Pro Val Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile
 115 120 125

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Leu Ile Ser Gln Asn Ala Lys
 130 135 140

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu Glu Pro Asp Val Gln
 145 150 155 160

Phe Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
 165 170 175

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

Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys

ES 2 385 754 T3

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Ser Ser Gln Thr Val
65 70 75 80

Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Thr Lys Ser Asn Leu Ile Lys Arg
85 90 95

Ile Glu Pro Arg Arg Pro Lys Pro Arg Pro Pro Thr Asp Ile Cys Ser
100 105 110

Cys Asp Asp Asn Leu Gly Arg Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
115 120 125

Pro Lys Asp Ile Leu Met Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
130 135 140

Val Val Asp Val Ser Glu Glu Glu Pro Asp Val Gln Phe Ser Trp Phe
145 150 155 160

Val Asp Asn Val Arg Val Phe Thr Ala Gln Thr Gln Pro His Glu Glu
165 170 175

Gln Leu Asn Gly Thr Phe Arg Val Val Ser Thr Leu His Ile Gln His
180 185 190

Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys
195 200 205

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

Ala Arg Thr Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Arg Glu Gln Met
225 230 235 240

Ser Lys Asn Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Val Thr Ser Phe Tyr Pro
245 250 255

Ala Ser Ile Ser Val Glu Trp Glu Arg Asn Gly Glu Leu Glu Gln Asp
260 265 270

Tyr Lys Asn Thr Leu Pro Val Leu Asp Ser Asp Glu Ser Tyr Phe Leu
275 280 285

ES 2 385 754 T3

Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Thr Asp Ser Trp Met Arg Gly Asp Ile
 290 295 300

Tyr Thr Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu His Asn His His Thr Gln
 305 310 315 320

Lys Asn Leu Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 20
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 20

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

10

ES 2 385 754 T3

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 . 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 21
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 21

5

10

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
 1 5 10 15

ES 2 385 754 T3

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro
 100 105 110

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

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
 130 135 140

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
 145 150 155 160

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 165 170 175

Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
 180 185 190

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
 195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
 210 215 220

Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
 225 230 235 240

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

ES 2 385 754 T3

245

250

255

Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
 260 265 270

Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
 275 280 285

Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
 290 295 300

Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
 305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 22

<211> 326

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

10

ES 2 385 754 T3

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

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

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

- <210> 23
- <211> 290
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <400> 23

ES 2 385 754 T3

Gln Met Gln Gly Val Asn Cys Thr Val Ser Ser Glu Leu Lys Thr Pro
 1 5 10 15

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

Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys
 35 40 45

Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 50 55 60

Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 65 70 75 80

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 85 90 95

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 100 105 110

Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Gln Val His
 115 120 125

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
 130 135 140

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asn Trp Leu Asp Gly Lys
 145 150 155 160

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 165 170 175

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 180 185 190

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

ES 2 385 754 T3

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 210 215 220

Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met
 225 230 235 240

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 245 250 255

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His
 260 265 270

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 275 280 285

Gly Lys
 290

<210> 24
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

5

10

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

ES 2 385 754 T3

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

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

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

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

5 <210> 25
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 385 754 T3

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 385 754 T3

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

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

Pro Gly Lys
 225

<210> 26

<211> 226

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mutante mFc

10

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15

ES 2 385 754 T3

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

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

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

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

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

Pro Gly
225

<210> 27

<211> 227

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mutante mFc

10

<400> 27

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

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

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

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

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

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

15

ES 2 385 754 T3

85

90

95

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 28

<211> 227

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mutante mFc

10

<400> 28

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

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

15

ES 2 385 754 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 29

<211> 227

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mutante mFc

10

<400> 29

ES 2 385 754 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

- <210> 30
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>

ES 2 385 754 T3

<223> secuencia señal
 <400> 30

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Met Asp

5

<210> 31
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> proteína de fusión

15

<400> 31

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Met Asp Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val
 20 25 30

Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val
 35 40 45

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

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

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

ES 2 385 754 T3

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

ES 2 385 754 T3

Ser Ser Trp Ile Gly Val Phe Arg Asn Ser Ser His His Pro Trp Val
 325 330 335

Thr Met Asn Gly Leu Ala Phe Lys His Glu Ile Lys Asp Ser Asp Asn
 340 345 350

Ala Glu Leu Asn Cys Ala Val Leu Gln Val Asn Arg Leu Lys Ser Ala
 355 360 365

Gln Cys Gly Ser Ser Ile Ile Tyr His Cys Lys His Lys Leu
 370 375 380

5 <210> 32
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> proteína de fusión

<400> 32

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Met Asp Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val
 20 25 30

Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val
 35 40 45

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

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

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 85 90 95

Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu
 100 105 110

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala

15

ES 2 385 754 T3

Tyr Leu Phe Pro Ser Phe Glu Thr Phe Asn Thr Lys Asn Cys Ile Ala
 355 360 365

Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ala Leu Asp Glu Ser Cys Glu Asp Lys Asn
 370 375 380

Arg Tyr Ile Cys Lys Gln Gln Leu Ile
 385 390

<210> 33

<211> 393

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión

10 <400> 33

Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Met Asp Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val
 20 25 30

Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val
 35 40 45

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

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

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 85 90 95

Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu
 100 105 110

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala
 115 120 125

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro

15

ES 2 385 754 T3

130						135										140
Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	
145					150					155					160	
Val	Ser	Leu	Tyr	Cys	Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	
				165					170					175		
Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	
			180					185					190			
Gln	Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	
		195					200					205				
Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	
	210					215					220					
Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	
225					230					235					240	
His	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Ser	Ser	Phe	Thr	Lys	Leu	Ser	Ile	Glu	Pro	
				245					250					255		
Ala	Phe	Thr	Pro	Gly	Pro	Asn	Ile	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Ser	Asp	Cys	
			260					265					270			
Cys	Ser	Cys	Gln	Glu	Lys	Trp	Val	Gly	Tyr	Arg	Cys	Asn	Cys	Tyr	Phe	
		275					280					285				
Ile	Ser	Ser	Glu	Gln	Lys	Thr	Trp	Asn	Glu	Ser	Arg	His	Leu	Cys	Ala	
	290					295					300					
Ser	Gln	Lys	Ser	Ser	Leu	Leu	Gln	Leu	Gln	Asn	Thr	Asp	Glu	Leu	Asp	
305					310					315					320	
Phe	Met	Ser	Ser	Ser	Gln	Gln	Phe	Tyr	Trp	Ile	Gly	Leu	Ser	Tyr	Ser	
				325					330					335		
Glu	Glu	His	Thr	Ala	Trp	Leu	Trp	Glu	Asn	Gly	Ser	Ala	Leu	Ser	Gln	
			340					345					350			
Tyr	Leu	Phe	Pro	Ser	Phe	Glu	Thr	Phe	Asn	Thr	Lys	Asn	Cys	Ile	Ala	
		355					360					365				

ES 2 385 754 T3

Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ala Leu Asp Glu Ser Cys Glu Asp Lys Asn
 370 375 380

Arg Tyr Ile Cys Lys Gln Gln Leu Ile
 385 390

<210> 34

<211> 382

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión

10 <400> 34

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Met Asp Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val
 20 25 30

Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val
 35 40 45

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

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

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 85 90 95

Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu
 100 105 110

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala
 115 120 125

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro
 130 135 140

Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys

ES 2 385 754 T3

<220>

<223> proteína de fusión

<400> 35

5

```

Met  Pro  Leu  Leu  Leu  Leu  Leu  Pro  Leu  Leu  Trp  Ala  Gly  Ala  Leu  Ala
1          5          10          15

Met  Asp  Val  Pro  Arg  Asp  Cys  Gly  Cys  Lys  Pro  Cys  Ile  Cys  Thr  Val
          20          25          30

Pro  Glu  Val  Ser  Ser  Val  Phe  Ile  Phe  Pro  Pro  Lys  Pro  Lys  Asp  Val
          35          40          45

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

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

Glu  Val  His  Thr  Ala  Gln  Thr  Lys  Pro  Arg  Glu  Glu  Gln  Phe  Asn  Ser
          85          90          95

Thr  Phe  Arg  Ser  Val  Ser  Glu  Leu  Pro  Ile  Met  His  Gln  Asp  Trp  Leu
          100          105          110

Asn  Gly  Lys  Glu  Phe  Lys  Cys  Arg  Val  Asn  Ser  Ala  Ala  Phe  Pro  Ala
          115          120          125

Pro  Ile  Glu  Lys  Thr  Ile  Ser  Lys  Thr  Lys  Gly  Arg  Pro  Lys  Ala  Pro
130          135          140

Gln  Val  Tyr  Thr  Ile  Pro  Pro  Pro  Lys  Lys  Gln  Met  Ala  Lys  Asp  Lys
145          150          155          160

Val  Ser  Leu  Thr  Cys  Met  Ile  Thr  Asp  Phe  Phe  Pro  Glu  Asp  Ile  Thr
          165          170          175

Val  Glu  Trp  Gln  Trp  Asn  Gly  Gln  Pro  Ala  Glu  Asn  Tyr  Lys  Asn  Thr

```


ES 2 385 754 T3

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

Met Asp Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val
20 25 30

Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val
35 40 45

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

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

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
85 90 95

Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu
100 105 110

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala
115 120 125

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro
130 135 140

Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys
145 150 155 160

Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr
165 170 175

Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr
180 185 190

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

ES 2 385 754 T3

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

<210> 37

<211> 537

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión

10

<400> 37

ES 2 385 754 T3

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Leu Glu Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile
20 25 30

Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu
35 40 45

Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg
50 55 60

Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr
65 70 75 80

Ile Asp Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr
85 90 95

Ile Ala Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala
100 105 110

Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val
115 120 125

Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe
130 135 140

Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys
145 150 155 160

His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met
165 170 175

Leu Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu
180 185 190

Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile
195 200 205

Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro
210 215 220

Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys

ES 2 385 754 T3

Phe Met Ser Ser Ser Gln Gln Phe Tyr Trp Ile Gly Leu Ser Tyr Ser
465 470 475 480

Glu Glu His Thr Ala Trp Leu Trp Glu Asn Gly Ser Ala Leu Ser Gln
485 490 495

Tyr Leu Phe Pro Ser Phe Glu Thr Phe Asn Thr Lys Asn Cys Ile Ala
500 505 510

Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ala Leu Asp Glu Ser Cys Glu Asp Lys Asn
515 520 525

Arg Tyr Ile Cys Lys Gln Gln Leu Ile
530 535

- <210> 38
- 5 <211> 454
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> proteina de fusión
- <400> 38

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
20 25 30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
35 40 45

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
50 55 60

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
65 70 75 80

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
85 90 95

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly

15

ES 2 385 754 T3

Gln Glu Lys Trp Val Gly Tyr Arg Cys Asn Cys Tyr Phe Ile Ser Ser
340 345 350

Glu Gln Lys Thr Trp Asn Glu Ser Arg His Leu Cys Ala Ser Gln Lys
355 360 365

Ser Ser Leu Leu Gln Leu Gln Asn Thr Asp Glu Leu Asp Phe Met Ser
370 375 380

Ser Ser Gln Gln Phe Tyr Trp Ile Gly Leu Ser Tyr Ser Glu Glu His
385 390 395 400

Thr Ala Trp Leu Trp Glu Asn Gly Ser Ala Leu Ser Gln Tyr Leu Phe
405 410 415

Pro Ser Phe Glu Thr Phe Asn Thr Lys Asn Cys Ile Ala Tyr Asn Pro
420 425 430

Asn Gly Asn Ala Leu Asp Glu Ser Cys Glu Asp Lys Asn Arg Tyr Ile
435 440 445

Cys Lys Gln Gln Leu Ile
450

<210> 39

<211> 536

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión

10 <400> 39

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

Met Asp Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val
20 25 30

Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val
35 40 45

Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile

15

ES 2 385 754 T3

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

ES 2 385 754 T3

Trp Glu Glu Ser Leu Leu Ala Cys Thr Ser Lys Asn Ser Ser Leu Leu
 290 295 300

Ser Ile Asp Asn Glu Glu Glu Met Lys Phe Leu Ser Ile Ile Ser Pro
 305 310 315 320

Ser Ser Trp Ile Gly Val Phe Arg Asn Ser Ser His His Pro Trp Val
 325 330 335

Thr Met Asn Gly Leu Ala Phe Lys His Glu Ile Lys Asp Ser Asp Asn
 340 345 350

Ala Glu Leu Asn Cys Ala Val Leu Gln Val Asn Arg Leu Lys Ser Ala
 355 360 365

Gln Cys Gly Ser Ser Ile Ile Tyr His Cys Lys His Lys Leu Gly Gly
 370 375 380

Ser Gly Gly Ser Arg Ser Ser Phe Thr Lys Leu Ser Ile Glu Pro Ala
 385 390 395 400

Phe Thr Pro Gly Pro Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser Asp Cys Cys
 405 410 415

Ser Cys Gln Glu Lys Trp Val Gly Tyr Arg Cys Asn Cys Tyr Phe Ile
 420 425 430

Ser Ser Glu Gln Lys Thr Trp Asn Glu Ser Arg His Leu Cys Ala Ser
 435 440 445

Gln Lys Ser Ser Leu Leu Gln Leu Gln Asn Thr Asp Glu Leu Asp Phe
 450 455 460

Met Ser Ser Ser Gln Gln Phe Tyr Trp Ile Gly Leu Ser Tyr Ser Glu
 465 470 475 480

Glu His Thr Ala Trp Leu Trp Glu Asn Gly Ser Ala Leu Ser Gln Tyr
 485 490 495

Leu Phe Pro Ser Phe Glu Thr Phe Asn Thr Lys Asn Cys Ile Ala Tyr
 500 505 510

<210> 40

<211> 35

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

10 <400> 40

ES 2 385 754 T3

ggatcctctt ttactaaact gagtattgag ccagc 35
 <210> 41
 <211> 45
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 10
 <400> 41
 gcggccgcag atctattaa tgagctgttg cttacagata taacg 45
 <210> 42
 <211> 30
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> cebador
 <400> 42
 ggatcccaga ggcacaacaa ttctccctg 30
 25 <210> 43
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 43
 gcggccgcag atctattaa gcttatgctt acaatg 36
 35 <210> 44
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> cebador
 <400> 44
 45 gctagcatgc cgctgctgct actgctgccc ctgctgtggg caggggccct ggctatggat .60
 gtgcccaggg attgtggttg 80
 <210> 45
 <211> 29
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 55 <400> 45
 ggatccttta ccaggagagt gggagaggc 29
 <210> 46
 <211> 43
 60 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 385 754 T3

<220>
 <223> cebador

 <400> 46
 5 ggccaaggat aaagtcagtc tgtactgcat gataacagac ttc 43

 <210> 47
 <211> 43
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 47
 15 gaagtctgtt atcatgcagt acagactgac ttatccttg gcc 43

 <210> 48
 <211> 44
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 48
 25 cagatggctc ttactcgtc accagcaagc tcaatgtgca gaag 44

 <210> 49
 <211> 44
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 49
 35 ctctgcaca ttgagcttc tggtgacgaa gtaagagcca tctg 44

 <210> 50
 <211> 33
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 50
 50 ccattccacc tccaagaag cagatggcca agg 33

 <210> 51
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 51
 60 gctctactt cgtctacagc gacctcaatg tgcagaagag caac 44

 <210> 52
 <211> 41
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 385 754 T3

<220>
<223> cebador

<400> 52
5 gaacctcag cccatcatga agacagatgg ctcttacttc g 41

<210> 53
<211> 36
<212> ADN
10 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 53
15 ccaccatact gaggagagcc tctcccactc tctctgg 36

<210> 54
<211> 300
20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína de fusión

25 <400> 54

ES 2 385 754 T3

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
 1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
 20 25 30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
 35 40 45

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
 50 55 60

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
 65 70 75 80

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
 85 90 95

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly
 100 105 110

Ser Gly His Met His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 115 120 125

Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
 130 135 140

His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met
 145 150 155 160

ES 2 385 754 T3

Ala Asp Ile Gly Ser Gln Arg His Asn Asn Ser Ser Leu Asn Thr Arg
 165 170 175

Thr Gln Lys Ala Arg His Cys Gly His Cys Pro Glu Glu Trp Ile Thr
 180 185 190

Tyr Ser Asn Ser Cys Tyr Tyr Ile Gly Lys Glu Arg Arg Thr Trp Glu
 195 200 205

Glu Ser Leu Leu Ala Cys Thr Ser Lys Asn Ser Ser Leu Leu Ser Ile
 210 215 220

Asp Asn Glu Glu Glu Met Lys Phe Leu Ser Ile Ile Ser Pro Ser Ser
 225 230 235 240

Trp Ile Gly Val Phe Arg Asn Ser Ser His His Pro Trp Val Thr Met
 245 250 255

Asn Gly Leu Ala Phe Lys His Glu Ile Lys Asp Ser Asp Asn Ala Glu
 260 265 270

Leu Asn Cys Ala Val Leu Gln Val Asn Arg Leu Lys Ser Ala Gln Cys
 275 280 285

Gly Ser Ser Ile Ile Tyr His Cys Lys His Lys Leu
 290 295 300

<210> 55

<211> 394

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión

10 <400> 55

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Leu Glu Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile
 20 25 30

Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu
 35 40 45

ES 2 385 754 T3

Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg
 50 55 60

Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr
 65 70 75 80

Ile Asp Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr
 85 90 95

Ile Ala Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala
 100 105 110

Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val
 115 120 125

Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe
 130 135 140

Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys
 145 150 155 160

His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met
 165 170 175

Leu Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu
 180 185 190

Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile
 195 200 205

Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro
 210 215 220

Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys
 225 230 235 240

Ser Asp Leu Val Pro Arg Gly Ser Ser Phe Thr Lys Leu Ser Ile Glu
 245 250 255

Pro Ala Phe Thr Pro Gly Pro Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser Asp
 260 265 270

ES 2 385 754 T3

Cys Cys Ser Cys Gln Glu Lys Trp Val Gly Tyr Arg Cys Asn Cys Tyr
 275 280 285

Phe Ile Ser Ser Glu Gln Lys Thr Trp Asn Glu Ser Arg His Leu Cys
 290 295 300

Ala Ser Gln Lys Ser Ser Leu Leu Gln Leu Gln Asn Thr Asp Glu Leu
 305 310 315 320

Asp Phe Met Ser Ser Ser Gln Gln Phe Tyr Trp Ile Gly Leu Ser Tyr
 325 330 335

Ser Glu Glu His Thr Ala Trp Leu Trp Glu Asn Gly Ser Ala Leu Ser
 340 345 350

Gln Tyr Leu Phe Pro Ser Phe Glu Thr Phe Asn Thr Lys Asn Cys Ile
 355 360 365

Ala Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ala Leu Asp Glu Ser Cys Glu Asp Lys
 370 375 380

Asn Arg Tyr Ile Cys Lys Gln Gln Leu Ile
 385 390

<210> 56

<211> 24

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

10 <400> 56

agcttggcgg tagcggcggt agca 24

<210> 57

<211> 24

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

20 <400> 57

gatctgctac cgccgctacc gccca 24

<210> 58

<211> 43

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> cebador

<400> 58

gttgtcctc tggctaccgc cgctaccgcc aatgagctgt tgc 43

ES 2 385 754 T3

<210> 59

<211> 537

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión

10 <400> 59

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

Met Asp Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val
20 25 30

Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val
35 40 45

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

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

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
85 90 95

Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu
100 105 110

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala
115 120 125

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro
130 135 140

15

ES 2 385 754 T3

Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys
 145 150 155 160

Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr
 165 170 175

Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr
 180 185 190

Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu
 195 200 205

Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser
 210 215 220

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

His Ser Pro Gly Lys Gly Ser Phe Leu Glu Gln Asn Asn Ser Ser Pro
 245 250 255

Asn Thr Arg Thr Gln Lys Ala Arg His Cys Gly His Cys Pro Glu Glu
 260 265 270

Trp Ile Thr Tyr Ser Asn Ser Cys Tyr Tyr Ile Gly Lys Glu Arg Arg
 275 280 285

Thr Trp Glu Glu Ser Leu Leu Ala Cys Thr Ser Lys Asn Ser Ser Leu
 290 295 300

Leu Ser Ile Asp Asn Glu Glu Glu Met Lys Phe Leu Ala Ser Ile Leu
 305 310 315 320

Pro Ser Ser Trp Ile Gly Val Phe Arg Asn Ser Ser His His Pro Trp
 325 330 335

Val Thr Ile Asn Gly Leu Ala Phe Lys His Lys Ile Lys Asp Ser Asp
 340 345 350

Asn Ala Glu Leu Asn Cys Ala Val Leu Gln Val Asn Arg Leu Lys Ser
 355 360 365

ES 2 385 754 T3

Ala Gln Cys Gly Ser Ser Met Ile Tyr His Cys Lys His Lys Leu Gly
 370 375 380

Gly Ser Gly Gly Ser Arg Ser Ser Phe Thr Lys Leu Ser Ile Glu Pro
 385 390 395 400

Ala Phe Thr Pro Gly Pro Asn Ile Glu Leu Gln Lys Asp Ser Asp Cys
 405 410 415

Cys Ser Cys Gln Glu Lys Trp Val Gly Tyr Arg Cys Asn Cys Tyr Phe
 420 425 430

Ile Ser Ser Glu Gln Lys Thr Trp Asn Glu Ser Arg His Leu Cys Ala
 435 440 445

Ser Gln Lys Ser Ser Leu Leu Gln Leu Gln Asn Thr Asp Glu Leu Asp
 450 455 460

Phe Met Ser Ser Ser Gln Gln Phe Tyr Trp Ile Gly Leu Ser Tyr Ser
 465 470 475 480

Glu Glu His Thr Ala Trp Leu Trp Glu Asn Gly Ser Ala Leu Ser Gln
 485 490 495

Tyr Leu Phe Pro Ser Phe Glu Thr Phe Asn Thr Lys Asn Cys Ile Ala
 500 505 510

Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ala Leu Asp Glu Ser Cys Glu Asp Lys Asn
 515 520 525

Arg Tyr Ile Cys Lys Gln Gln Leu Ile
 530 535

5 <210> 60
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 60
 gtaaaggatc cctggagcag aacaattctt cccctaatac aagaactcag 50

15 <210> 61
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 61
 ctgagttctt gtattagggg aagaattgtt ctgctccagg gatcctttac 50

ES 2 385 754 T3

<210> 62
 <211> 44
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 10 <400> 62
 atgaaattc tggcttccat ttgcatcc tcatggattg gtgt 44

 <210> 63
 <211> 45
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 20
 <400> 63
 ccatgaggat ggcaaatgg aagccagaaa ttcattct tcttc 45

 <210> 64
 <211> 45
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> cebador

 <400> 64
 catcatccat gggtagcaat aaatggttg gcttcaaac atgag 45

 35 <210> 65
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> cebador

 <400> 65
 45 ctcatgttg aaagccaaac cattattgt cacccatgga tgatg 45

 <210> 66
 <211> 51
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 66
 55 ggctttcaaa cataaaataa aagactcaga taatgctgaa cttaactgtg c 51

 <210> 67
 <211> 51
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 65 <400> 67
 ctgagtcctt tattttatgt ttgaaagcca aaccattcat tgtcacccat g 51

ES 2 385 754 T3

<210> 68
<211> 50
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

10 <400> 68
gcccaagtgtg gatctcaat gatatatcat tgtaagcata agcttggcgg 50

<210> 69
<211> 50
15 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

20 <400> 69
ccgccaagct tatgcttaca atgatatac attgaagatc cacactgggc 50

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 comprendiendo una parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 y una parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94.
2. Proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 según la reivindicación 1, comprendiendo además un polipéptido de inmunoglobulina comprendiendo todo o parte de un dominio Fc o variante de éste.
- 10 3. Proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 según la reivindicación 2, donde el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se une al N-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2, y el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 se une al polipéptido de inmunoglobulina.
- 15 4. Proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 según la reivindicación 2, donde el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 se une al N-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94, y el C-terminal de la parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se une al polipéptido de inmunoglobulina.
- 20 5. Proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, donde la parte soluble de una secuencia de aminoácidos NKG2 y parte soluble de una secuencia de aminoácidos CD94 se unen por un enlazador peptídico comprendiendo glicina y serina.
- 25 6. Proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un receptor CD94/NKG2A, CD94/NKG2B, CD94/NKG2C, CD94/NKG2E, o CD94/NKG2F.
7. Proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 según la reivindicación 6, que es CD94/NKG2A.
- 30 8. Proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2A según la reivindicación 7, comprendiendo los residuos 99-233 de la SEC ID n°: 1.
9. Proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 según la reivindicación 6, que es CD94/NKG2C.
- 35 10. Proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2C según la reivindicación 9, comprendiendo los residuos 96-231 de la SEC ID n°: 3.
11. Proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo los residuos 35-179 de la SEC ID n°: 2.
- 40 12. Proteína de fusión receptora soluble CD94/NKG2A comprendiendo la secuencia de cualquiera de las SEC ID n°: 37-39.
13. Dímero de la proteína de fusión receptora monocatenaria soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 45 14. Método para producción de una proteína de fusión receptora soluble CD94/NKG2, comprendiendo cultivo de una célula comprendiendo un ácido nucleico que codifica el receptor soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las reivindicaciones precedentes bajo condiciones adecuadas para expresión del receptor soluble CD94/NKG2.
- 50 15. Composición farmacéutica comprendiendo una cantidad eficaz de la proteína de fusión receptora soluble CD94/NKG2 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente.

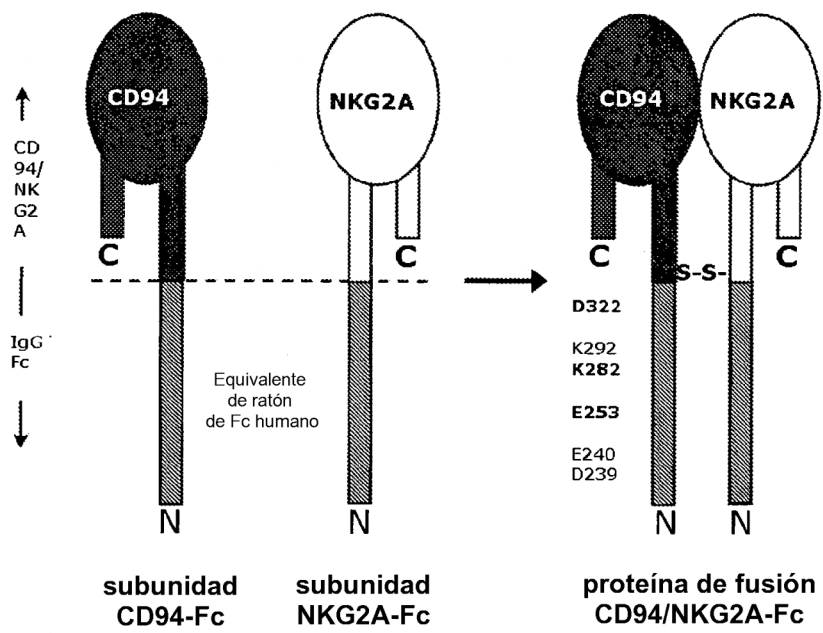


Figura 1

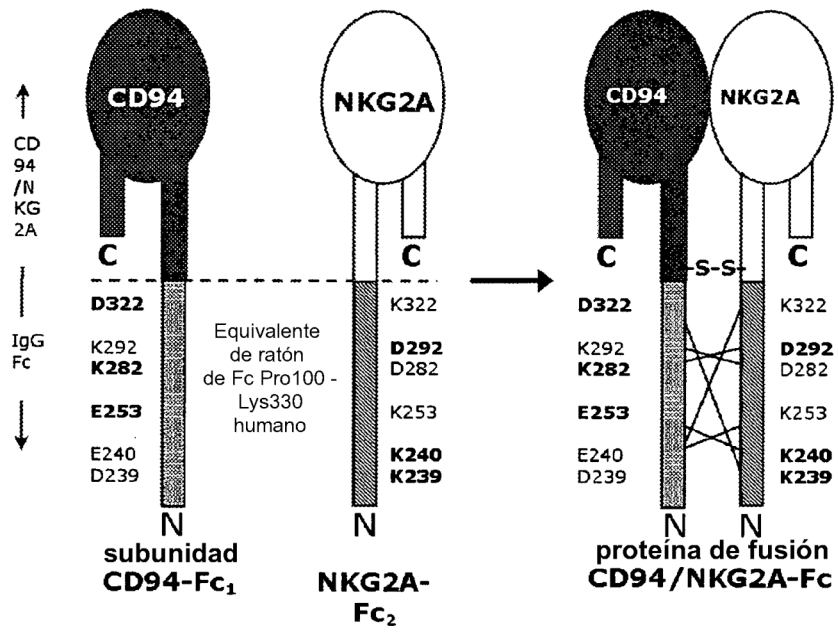


Figura 2

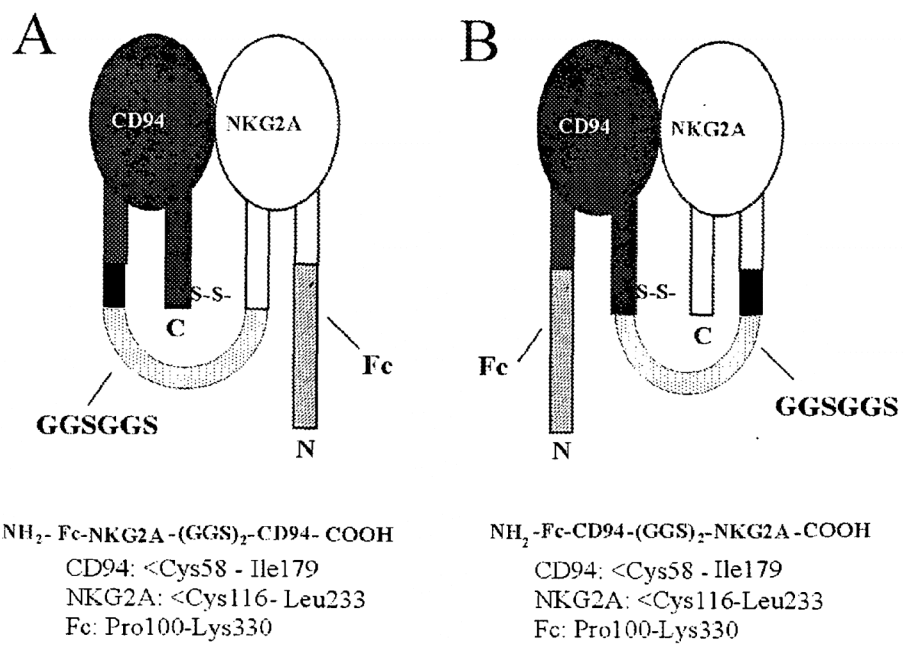


Figura 3

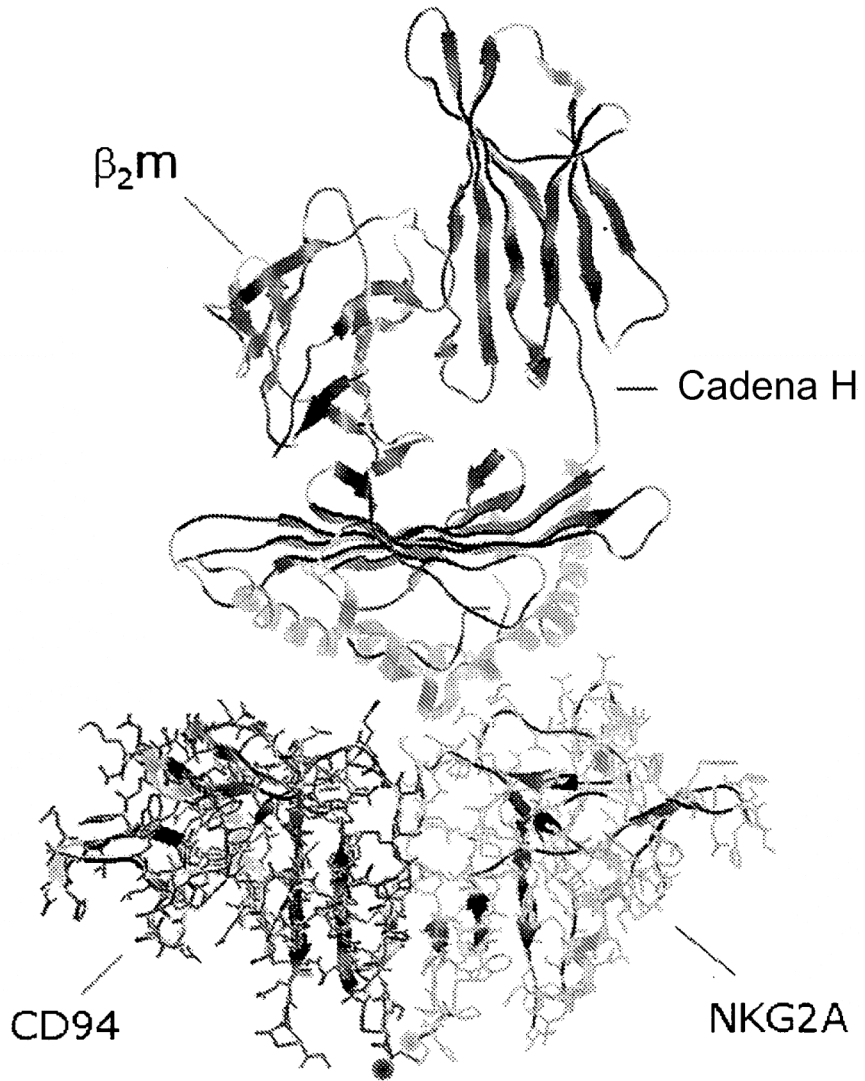


Figura 4

ES 2 385 754 T3

1	2	3	4	5	6
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
ASTKGP	SVFPLAPSSK	STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT	VSWN	SGALTS	SGVHTFFPAVLQSS KM
ASTKGP	SVFPLAPSSK	STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT	VSWN	SGALTS	SGVHTFFPAVLQSS GM
7	8	9	10	11	12
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
GLYSL	SSVVTVPSSSLGTQTYICNVN	NHKPSNTKVDK	KVEPK	SCDKTHTC	PPCPAPPELLGG KM
GLYSL	SSVVTVPSSSLGTQTYICNVN	NHKPSNTKVDK	RVEPK	SCDKTHTC	PPCPAPPELLGG GM
13	14	15	16	17	18
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
PSVFL	FPPKPKDTLMISRTPEVTCV	VVDVSHEDPEVK	FNWYVDG	VEVHNAKTK	PREEQYN KM
PSVFL	FPPKPKDTLMISRTPEVTCV	VVDVSHEDPEVK	FNWYVDG	VEVHNAKTK	PREEQYN GM
19	20	21	22	23	24
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
STYRV	SVLTVLHQDWLNGKEYKCKV	SNKALPAPIEKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSRDE	KM
STYRV	SVLTVLHQDWLNGKEYKCKV	SNKALPAPIEKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSRDE	GM
25	26	27	28	29	30
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890					
LTKNQ	VSILTCLVKGFYPSDIAVEWES	NGQPENNYKTTPPVLDSDGS	FFLYSKLTV	DKSRW	KM
LTKNQ	VSILTCLVKGFYPSDIAVEWES	NGQPENNYKTTPPVLDSDGS	FFLYSKLTV	DKSRW	GM
31	32	33			
123456789012345678901234567890					
QQGNV	FSCSVMHEALHNHYTQKSLS	LSPGK			KM
QQGNV	FSCSVMHEALHNHYTQKSLS	LSPGK			GM

Figura 5

1	2	3	4	5	6	
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS						Kap
1	2	3	4	5	6	
123456789012345678901234567890123456789012345678901 234567890						
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG-VETTTPSKQ						Lam
7	8	9	10			
12345678901234567890123456789012345678901234567890123456						
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC						Kap
7	8	9	10			
12345678901234567890123456789012 3456789012345						
SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQCQTNEG--STVEKTVAPTECS						Lam

Figura 6

```

0          1          2          3          4          5
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
AETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPEPVTWNSGALSSGVHTFPAVLQS- GC1_RAT
-TTTAPSVYPLVPGCDTSGSSVTLGCLVKGYFPEPVTWNSGALSSGVHTFPAVLQS- GC3_MOUSE
AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSTVLGCLVKGYFPEPVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS- GCAA_MOUSE
AKTTAPSVYPLVPCGDTTGSSTVLGCLVKGYFPEPVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS- GCAB_MOUSE
AETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPEPVTWNSGALSSGVHTFPAVLQS- GCA_RAT
AKTTAPSVYPLAPCGDTTGSSTVLGCLVKGYFPESVTWNSGSLSSVHTFPAVLQS- GCB_MOUSE
AQTTAPSVYPLAPGCGDTTGSSTVLGCLVKGYFPEPVTWNSGALSSDVHTFPAVLQS- GCB_RAT
ARTTAPSVYPLVPGCSGTSGSLVTLGCLVKGYFPEPVTWNSGALSSGVHTFPAVLQS- GCC_RAT
ASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSS IGHG1_HUMAN
AKTTAPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS- IGHG1_MOUSE
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSS IGHG2_HUMAN
-----QMGGVNVCTVSSSELKTP-----LGDTHHTCPRCPEP- IGHG3_HUMAN
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSS IGHG4_HUMAN
          :.* *.. : .          * . :.* :.

6          7          8          9          10         11
1234567890123456789012345678901234567890123.456789012.....3
GLYTLTSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKIVPRNC---GGDCKPC----ICT GC1_RAT
GPLYLSSSLVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKIVPRIP---KPSTPPG---SSCP GC3_MOUSE
DLYTLSSSVTVPSSTWPSQITCNVAHPASSTKVDKIVPRGP---TIKPCPPC---KCP GCAA_MOUSE
GLYTLSSSVTVPSSTWPSQITCNVAHPASSTKVDKIVPRVPI-TQNPCPPHQRVPPCA GCAB_MOUSE
GLYTLTSSVTVPSSTWSSQAVTCNVAHPASSTKVDKIVPREP-----NPC----GCT GCA_RAT
GLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPISTINPCPPCKECHKCP GCB_MOUSE
GLYTLTSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKIVERRNGG-IGHKCPCTCPTCHKCP GCB_RAT
GLYTLSSSVTVPSSTWSSQTVTCSVAHPATKSNLIKRIEPRRP---KPRPPT---DICS GCC_RAT
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKIVKPKSC-DKTHTCPPC-----P IGHG1_HUMAN
DLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDC----GCKPC----ICT IGHG1_MOUSE
GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKIVKPKSC----VECPCC-----P IGHG2_HUMAN
-----KSCDTPPCPRCPEPKSCDTPPCPRCP-----EPKSC----DTPPPC---PRCP IGHG3_HUMAN
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKIVKPKSC-----PPC---PSCP IGHG4_HUMAN
          .* * . . . . . * . .

```

Figura 7A

```

12      13      14      15      16      17
456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123
GSEV--SSVFI FPPKPKDVL TITLTPKVT CVVVDISQDDPEVHFSWFVDDVEVHTAQTR GC1_RAT
PGNILGGPSVFI FPPKPKDALMISLTPKVT CVVVDVSEDDPDVHVSWFVDNKEVHTAWTQ GC3_MOUSE
APNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVT CVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTO GCAA_MOUSE
APDLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPMVT CVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTO GCAB_MOUSE
GSEV--SSVFI FPPKTKDVL TITLTPKVT CVVVDISQNDPEVRFVSWFIDDEVHTAQTH GCA_RAT
APNLEGGPSVFI FPPNIKDVLMI SLTPKVT CVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTO GCB_MOUSE
VPELLGGPSVFI FPPKPKDILLISQNAKVTCVVVDVSEEDPDVQFSWFVNNVEVHTAQTO GCB_RAT
CDDNLGRPSVFI FPPKPKDILMI TLTLPKVT CVVVDVSEEDPDVQFSWFVNDVNRVFTAQTO GCC_RAT
APELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK IGHG1_HUMAN
VPEV--SSVFI FPPKPKDVL TITLTPKVT CVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTO IGHG1_MOUSE
APPV-AGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK IGHG2_HUMAN
APELLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTK IGHG3_HUMAN
APEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK IGHG4_HUMAN
. . . . .
.***:***: ** * *: .. *****:*...*:...*...:..*..* *:
. . . . .

18      19      20      21      22      23
456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123
PPEEQFNSTFRVVSALPIHQDWMRGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGRAQTPQVYT GC1_RAT
PREAQYNSTFRVVSALPIHQDWMRGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGRAQTPQVYT GC3_MOUSE
THREDYNSTLRVVSALPIHQDWMRGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYV GCAA_MOUSE
THREDYNSTLRVVSALPIHQDWMRGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPRGPVRAQVYV GCAB_MOUSE
APEKQSNSTLRVVSALPIVHRDNLNGKTFKCKVNSGAPPAPIEKSISKPEGTPRGPQVYT GCA_RAT
THREDYNSTIRVVSTLPIHQDWMRGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKIKGLVRAPQVYI GCB_MOUSE
PREEQYNSTFRVVSALPIHQDWMRGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGLVRKQVYV GCB_RAT
PHEEQLNSTFRVVSALPIHQDWMRGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPRGKARTPQVYT GCC_RAT
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIERTISKAKGQPREPQVYT IGHG1_HUMAN
PREEQFNSTFRVVSALPIHQDWMRGKEFKCKVNSAAPPAPIEKSISKTKGRPKAPQVYT IGHG1_MOUSE
PREEQFNSTFRVVSALTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIERTISKTKGQPREPQVYT IGHG2_HUMAN
PREEQFNSTFRVVSALTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIERTISKTKGQPREPQVYT IGHG3_HUMAN
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYT IGHG4_HUMAN
. . . *.* * * * : *...: * : :*:... :*:...:*** .* : :**

```

Figura 7B

```

                24         25         26         27         28         29
456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123
MSPTKEEMTQNEVSIITCMVKGFPDIIYVEWQMNQPPQENYKNTPTMDTDGSYFLYSKL GC1_RAT
I PPPREQMSKKVSLTCLVTNFPFEAISVWEWERNGELEQDYKNTPPILDSDGTYFLYSKL GC3_MOUSE
L PPPPEEMTKKQVTLTLCMVTDFMPEDIYVEWTTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSYFMYSKL GCAA_MOUSE
L PPPAEEMTKKEFSLTCLMIGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKL GCAB_MOUSE
M APPKEEMTQSQVSIITCMVKGFPDIIYVEWQMNQPPQENYKNTPTMDTDGSYFLYSKL GCA_RAT
L PPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFPNPGDISVEWTSNGHTEENYKNTAPVLDSDGSYFIYSKL GCB_MOUSE
M GPPTQLTEQTVSLTCLTSGFLPNDIGVEWTSNGHIEKNYKNTPEVLDSDGSFFMYSKL GCB_RAT
I PPPREQMSKNVSLTLCMVTSTFYPASISVWEWERNGELEQDYKNTLPVLDSDGSYFLYSKL GCC_RAT
L PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL IGHG1_HUMAN
I PPPKEQMAKDVSLTCLMIDDFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNNGSYFVYSKL IGHG1_MOUSE
L PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKL IGHG2_HUMAN
L PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKL IGHG3_HUMAN
L PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL IGHG4_HUMAN
: * . : : : . . : : * * : * . * . : * . : * : * . : : : : * : * * : *

                30         31         32
4567890123456789012345678901234567890
NVKKEKWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK GC1_RAT
TVDTDSWLQGEI FTCSVVHEALHNHHTQKNLSRSPGK GC3_MOUSE
RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTKFSRTPGK GCAA_MOUSE
RVQKSTWERSLFAFCSVVHEVLHNHLTKTISRSLGK GCAB_MOUSE
NVKKETWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK GCA_RAT
NMKTSKWEKTDSTFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK GCB_MOUSE
NVERSRWDSRAPFVCSVVHEGLHNHHTKISRPPGK GCB_RAT
SVDTDSWMRGIYTCVVHEALHNHHTQKNLSRSPGK GCC_RAT
TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK IGHG1_HUMAN
NVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK IGHG1_MOUSE
TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK IGHG2_HUMAN
TVDKSRWQQGNIFSCSCVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK IGHG3_HUMAN
TVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK IGHG4_HUMAN
. . . * : * . * * * : * * . : * . * *

```

Figura 7C

```

60
mFc_IGHG1 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
mFc_dm_NKG2A VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLTI TLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVD
mFc_dm_CD94 VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLTI TLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVD
mFc_sm_NKG2A VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLTI TLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVD
mFc_sm_CD94 VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLTI TLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVD
mFc VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLTI TLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVD
*****

120
mFc_IGHG1 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
mFc_dm_NKG2A DVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTK
mFc_dm_CD94 DVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTK
mFc_sm_NKG2A DVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTK
mFc_sm_CD94 DVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTK
mFc DVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTK
*****;*****

180
mFc_IGHG1 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
mFc_dm_NKG2A GRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMNT
mFc_dm_CD94 GRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMKT
mFc_sm_NKG2A GRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMDT
mFc_sm_CD94 GRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMDT
mFc GRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMDT
*****;*****

227
mFc_IGHG1 12345678901234567890123456789012345678901234567
mFc_dm_NKG2A NGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK
mFc_dm_CD94 DGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEESLSHSPGK
mFc_sm_NKG2A DGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK
mFc_sm_CD94 DGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK
mFc DGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK
DGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK
*****;*****

```

Figura 8

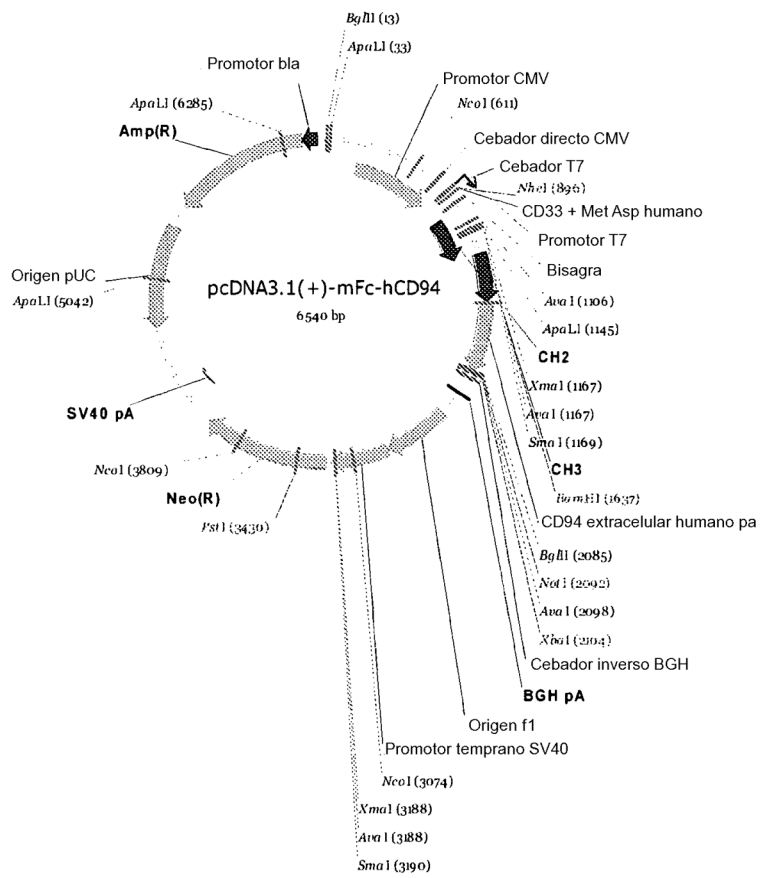


Figura 9

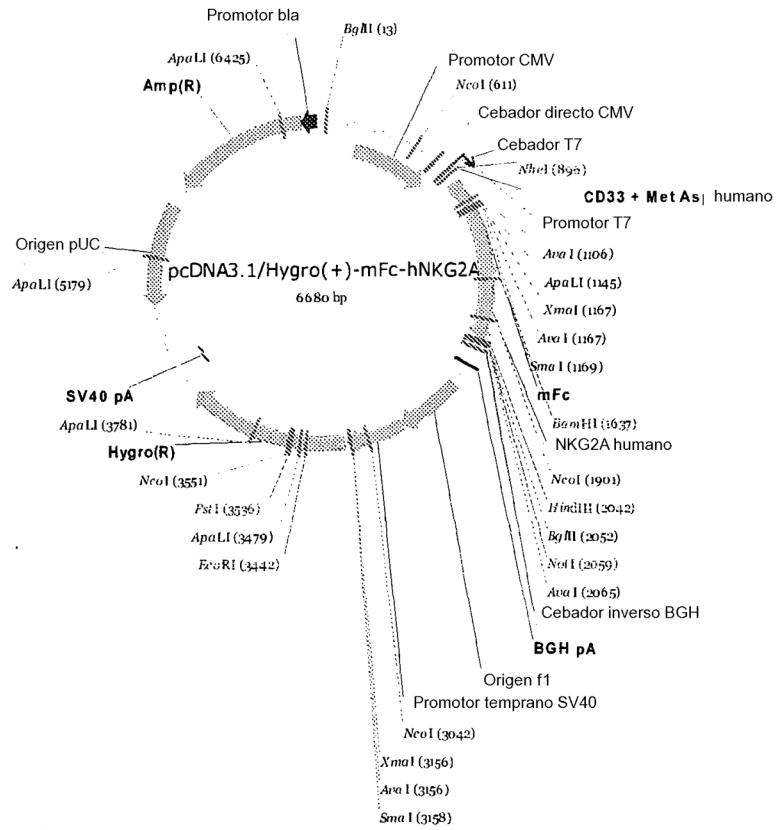


Figura 10

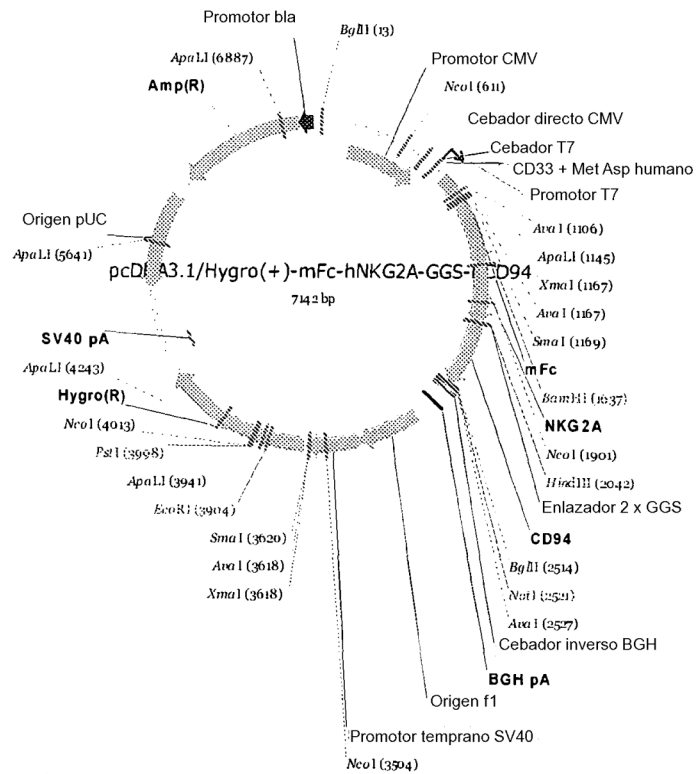


Figura 11

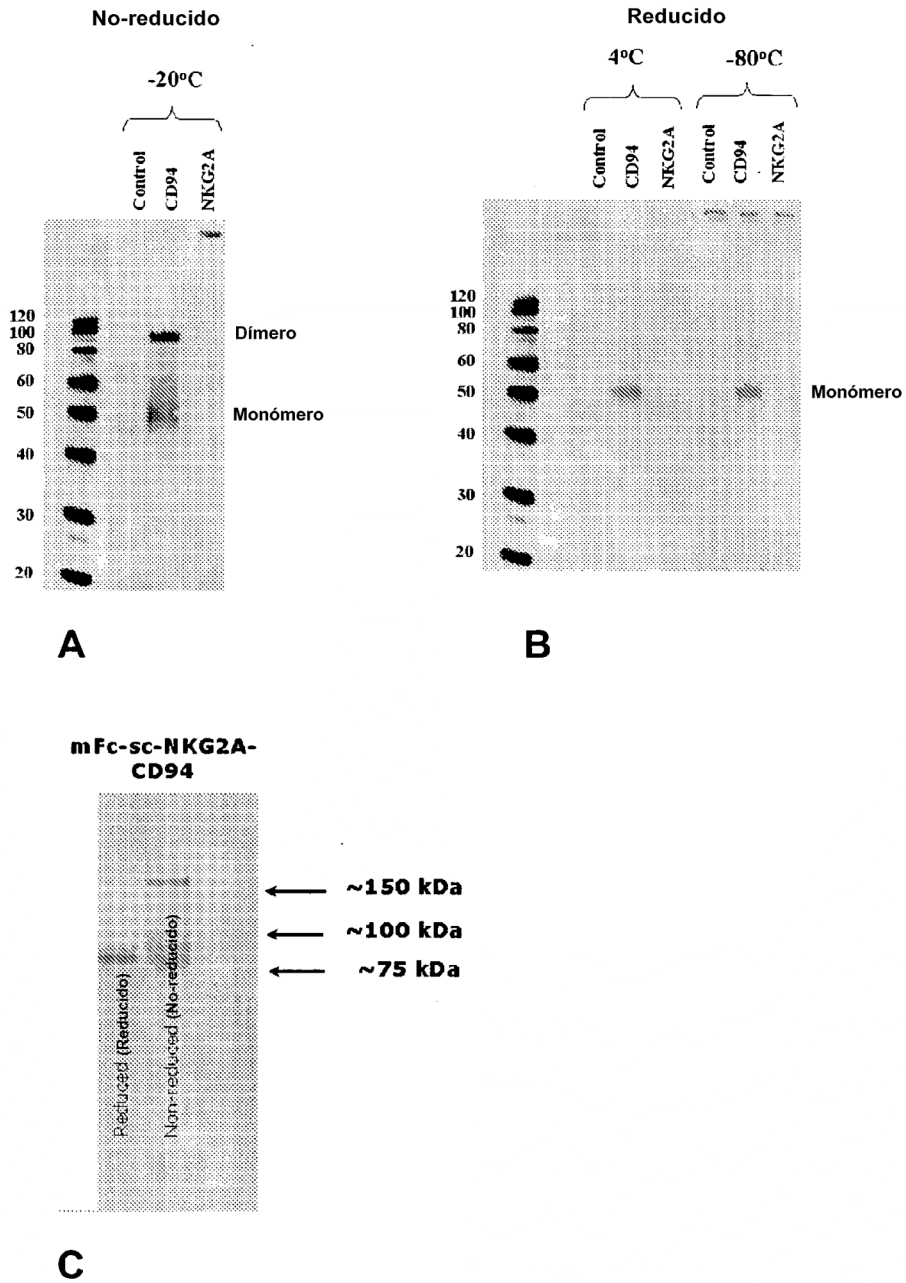
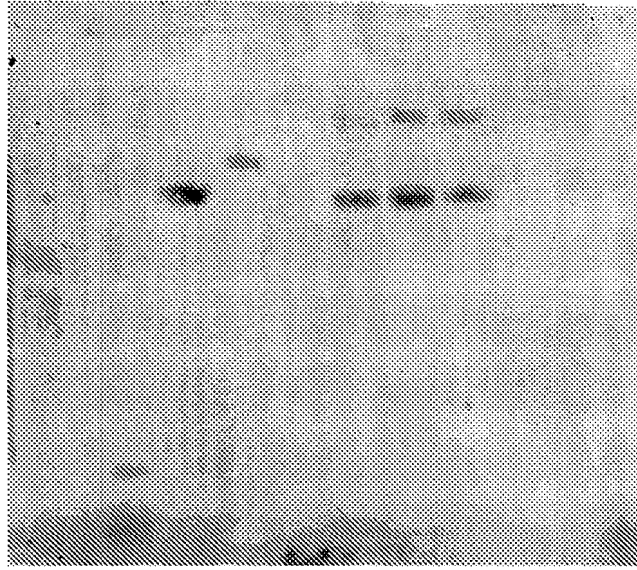
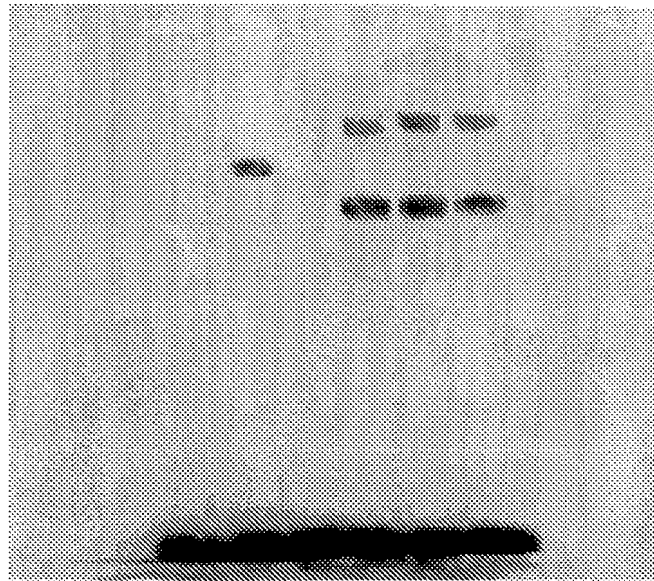


Figura 12

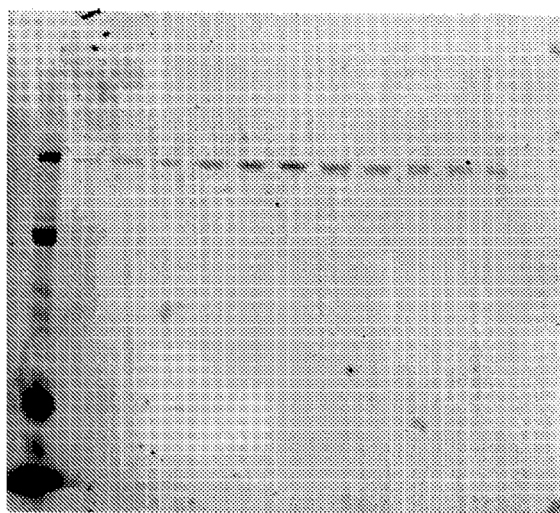


A

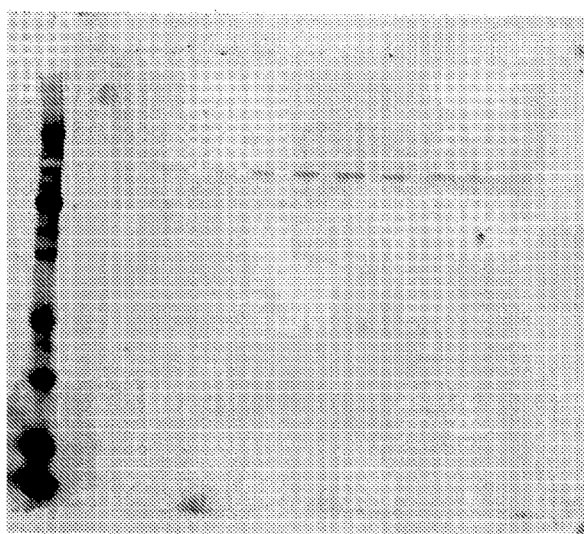


B

Figura 13



A



B

Figura 14

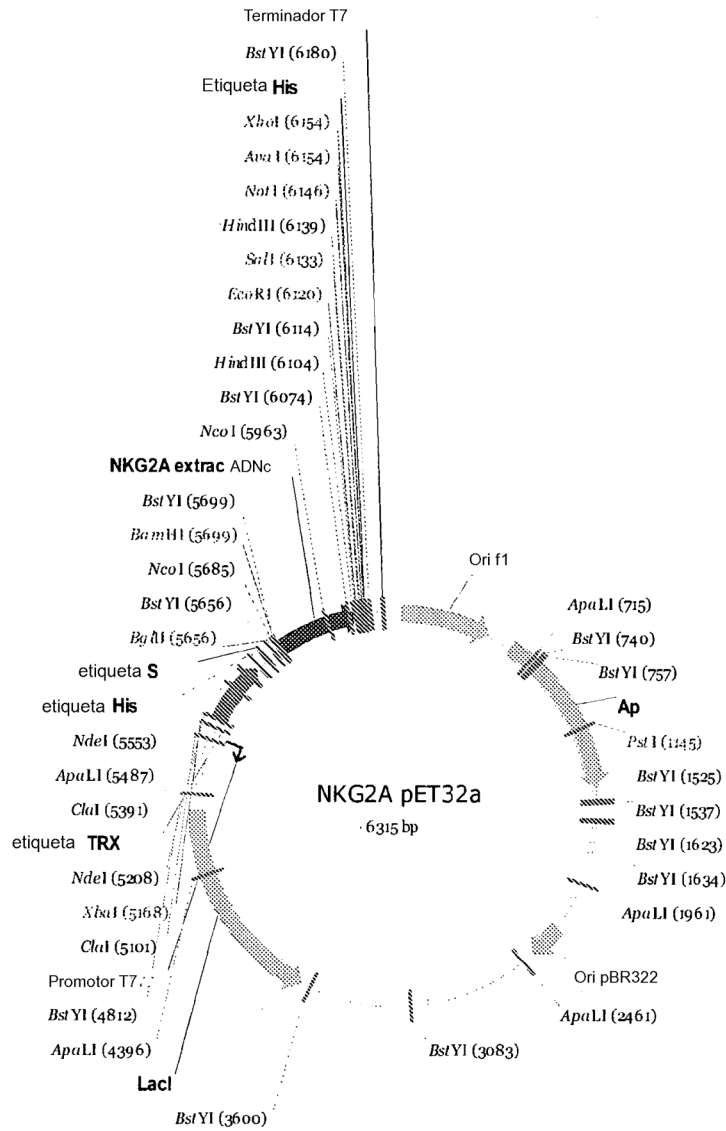


Figura 15

0.4 mM IPTG / h: 0 3 0 3
 s p s p s p s p

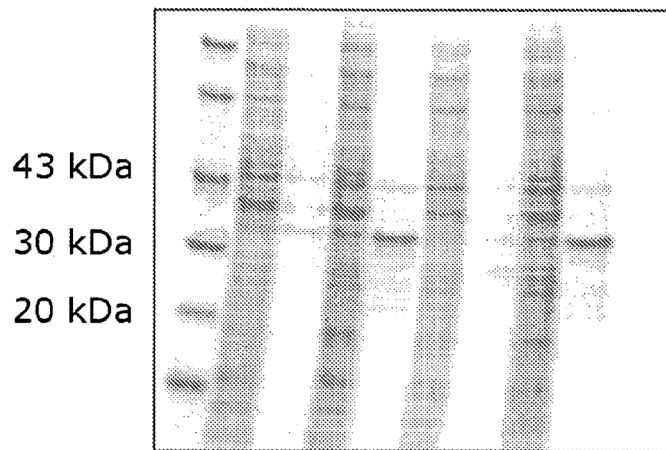


Figura 16

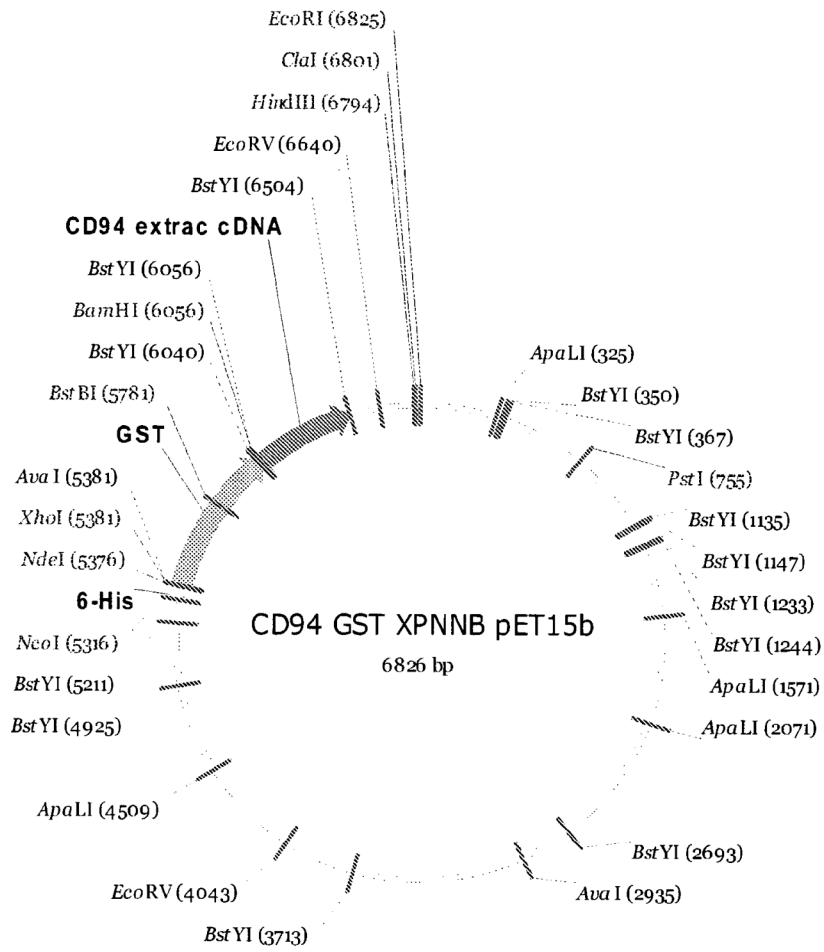


Figura 17

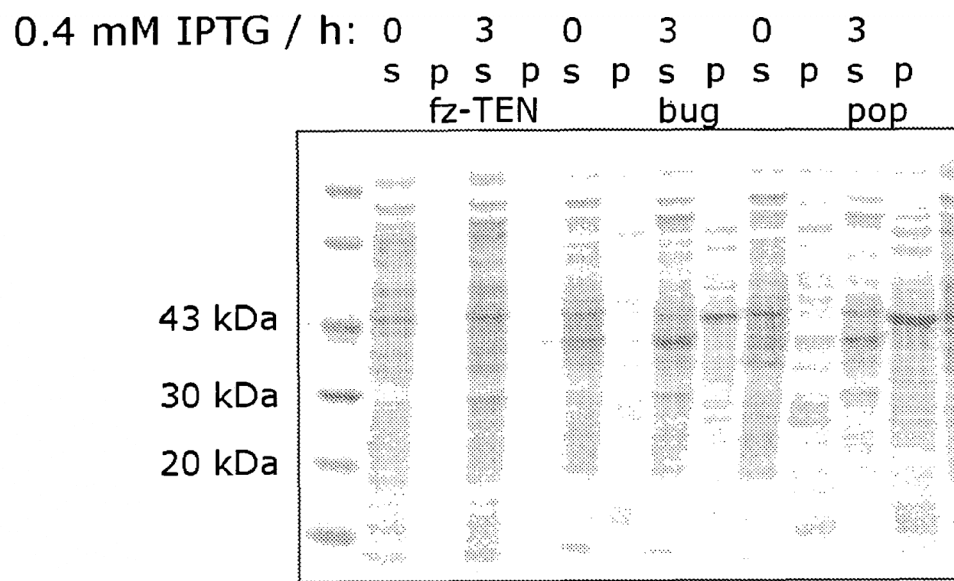
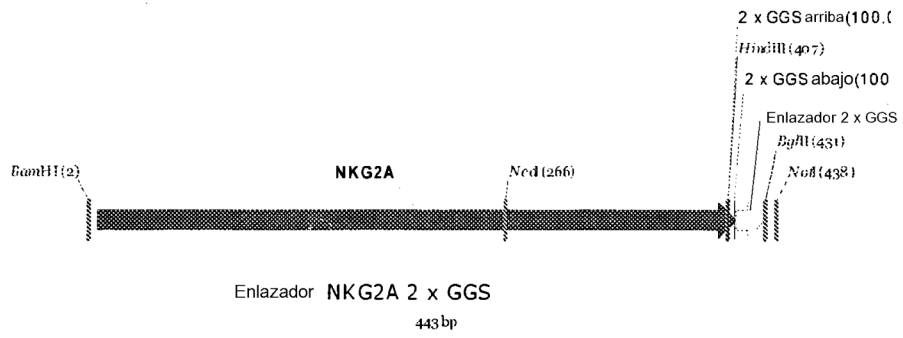
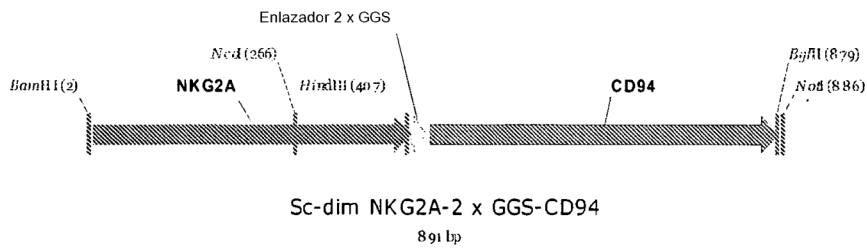


Figura 18



A



B

Figura 19

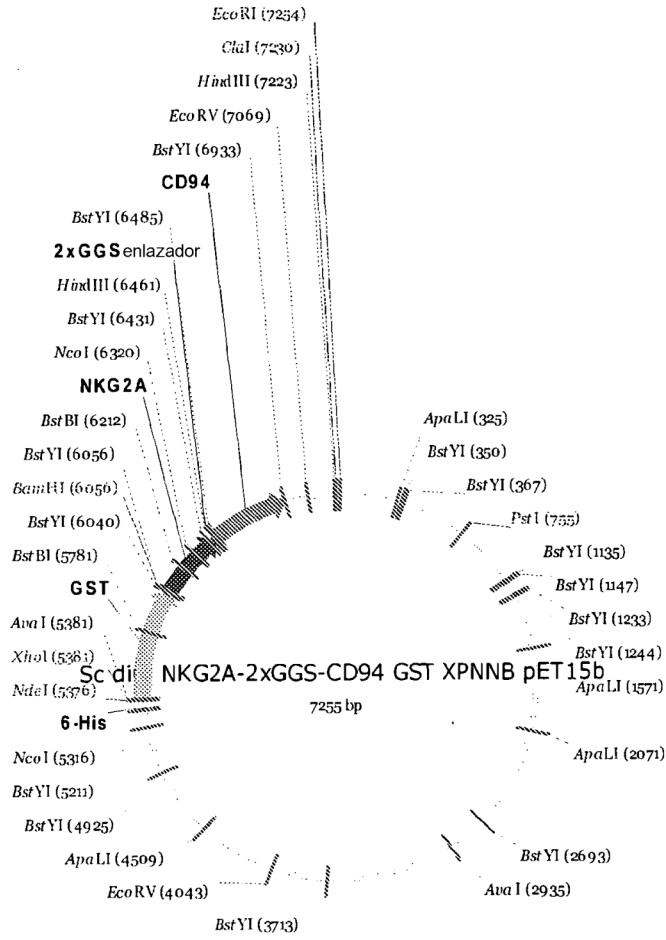


Figura 20

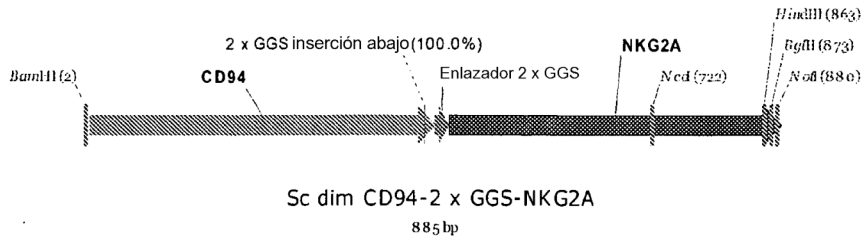


Figura 21

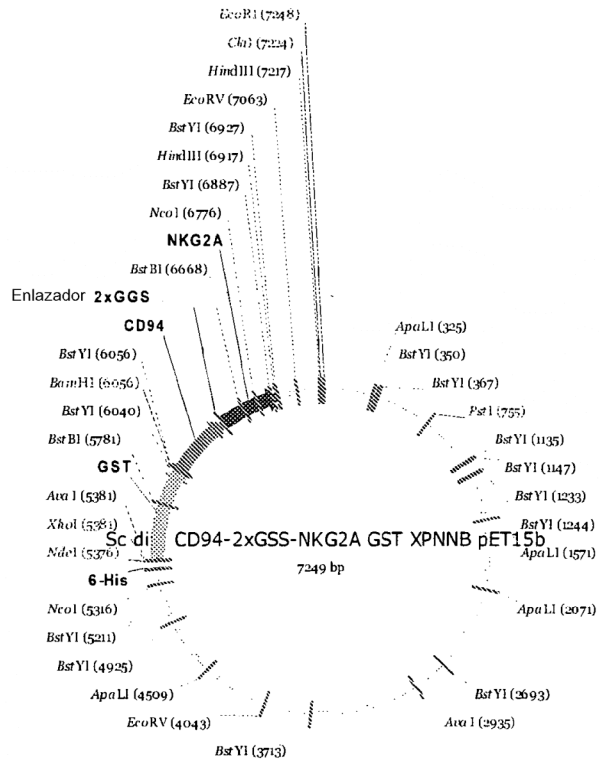


Figura 22

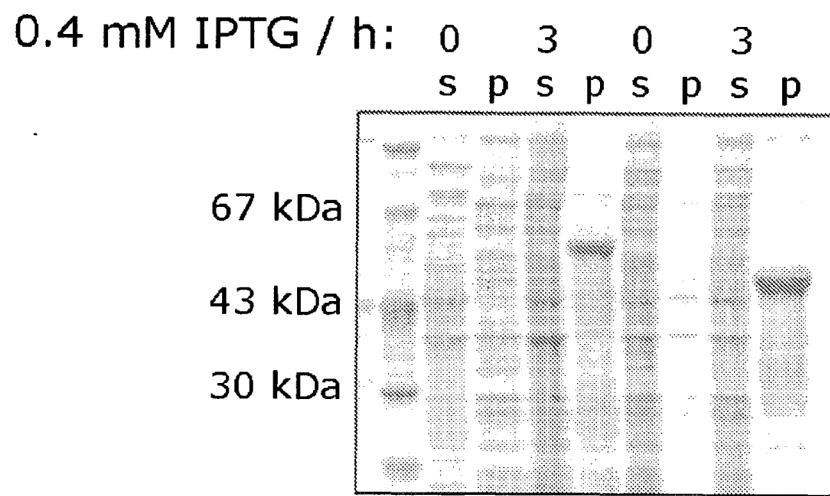


Figura 23

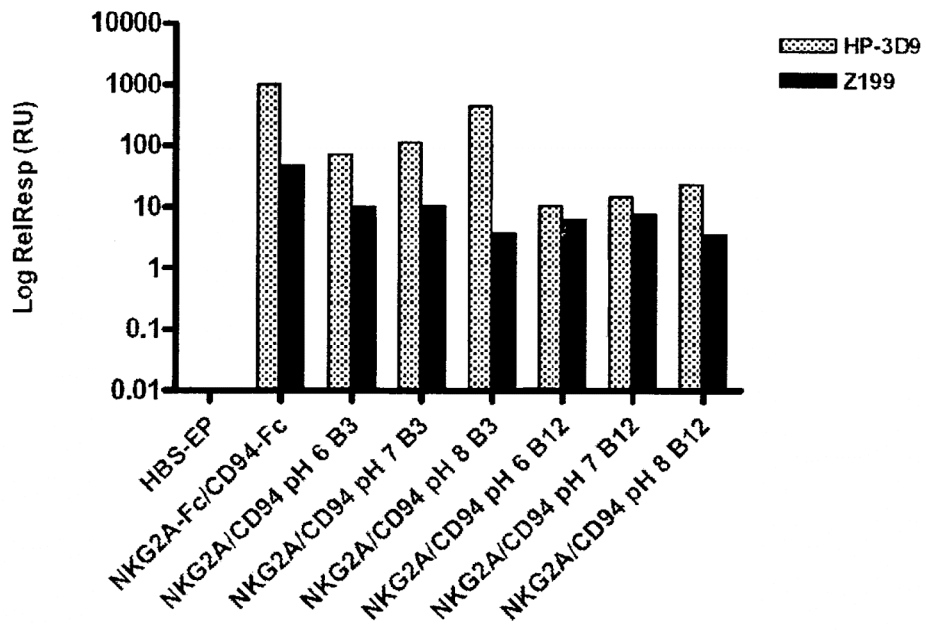


Figura 24

ES 2 385 754 T3

```

          9      10      11      12      13      14      15
NKG2A_94_233 4567890123456789012345678901234567890123456789012345678901A
NKG2B_76_215 PSTLIQRHNNSSLNTRTQKARHCGHCPEEWITYSNSCYIIGKERRTWEESLLACTSKN-
NKG2C_94_231 PS-----RHCCHCPEEWITYSNSCYIIGKERRTWEESLLACTSKN-
NKG2E_94_240 --IPFLEQNNSSPNTRTQKARHCGHCPEEWITYSNSCYIIGKERRTWEESLLACTSKN-
NKG2F_96_158 --IPFLEQNNSSPNTRTQKARPCGHCPEEWITYSNSCYIIGKERRTWEESLQACASKNS
-CIGVLEQNSFSLNRRMQKARHCGHCPEEWITYSNSCYIIGKERRTWEERV--C-----
          * ***** : *

          16      17      18      19      20      21
NKG2A_94_233 34567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
NKG2B_76_215 SLLSIDNEEEMKFLSIISPSSWIGVFRNSSHHPWVTMNGLAFKHEIKSDNAELNCAVL
NKG2C_94_231 SLLSIDNEEEMKFLSIISPSSWIGVFRNSSHHPWVTMNGLAFKHEIKSDNAELNCAVL
NKG2E_94_240 SLLSIDNEEEMKFLASILPSSWIGVFRNSSHHPWVTINGLAFKHKIKSDNAELNCAVL
NKG2F_96_158 SLLSIDNEEEMKFLASILPSSWIGVFRNSSHHPWVTINGLAFKHEIKSDHAERNCAML
-----W-PVLRRT-----LICFL--
          * *:*.* : *

          22      23
NKG2A_94_233 34567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
NKG2B_76_215 VNRLKSAQCGSSIIYHCKHKL-----
NKG2C_94_231 VNRLKSAQCGSSIIYHCKHKL-----
NKG2E_94_240 VNRLKSAQCGSSMIYHCKHKL-----
NKG2F_96_158 VRGLISDQCGSSRIIRRGFIMLTRLVLNS
-----

```

Figura 25

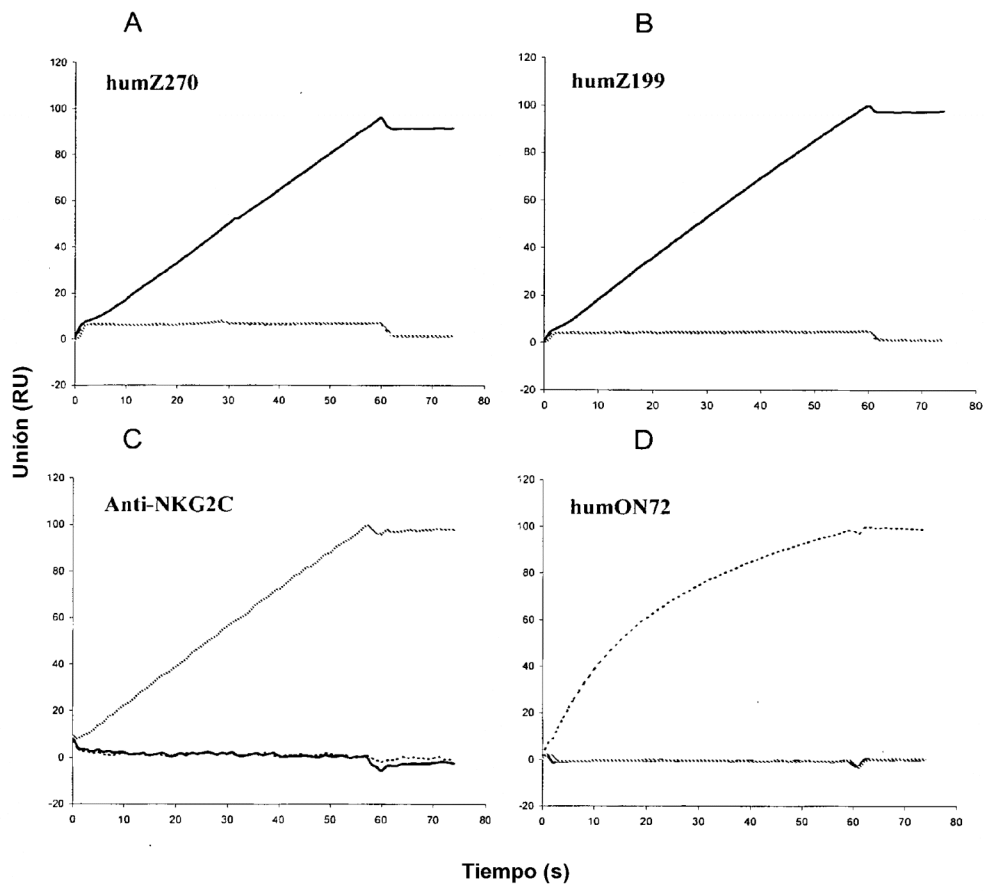


Figura 26