



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 855 998**

⑮ Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2016 PCT/EP2016/001344**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017 WO17025179**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2016 E 16753248 (0)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020 EP 3331904**

④ Título: **Etiqueta transglutamina para bioconjugación específica de sitio eficiente**

⑩ Prioridad:

07.08.2015 EP 15180278

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.09.2021

⑬ Titular/es:

MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

⑭ Inventor/es:

PIATER, BIRGIT;
BETZ, ULRICH;
KOLMAR, HARALD y
SIEGMUND, VANESSA

⑮ Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 855 998 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

Etiqueta transglutamina para bioconjugación específica de sitio eficiente

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención pertenece al campo de la bioconjugación, en particular al campo de la bioconjugación microbiana mediada por transglutaminasa y su uso para la fabricación de bioconjugados, como por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco.

10 **ANTECEDENTES**

La modificación de proteínas con moléculas sintéticas o naturales es una valiosa técnica para estudiar la función de las proteínas o para añadir propiedades adicionales a una proteína. Las bioconjugaciones que implican macromoléculas naturales o sintéticas, especialmente proteínas, surgen como una poderosa herramienta para 15 personalizar sus propiedades funcionales de arquitectura e ingeniería (véase p. ej., Perez y cols. Drug Discovery Today, 2014 Vol. 19 (7):869-881). La modificación o bioconjugación de proteínas habitualmente se realiza mediante la unión química o enzimática de una molécula adicional a la proteína de interés.

Las estrategias químicas que se utilizan actualmente para la conjugación de biomoléculas hacen uso del hecho de 20 que los restos de cisteína y lisina se pueden modificar fácilmente. Los restos de cisteína se pueden alquilar haciéndolos reaccionar con α -halocetonas o aceptores de Michael, como los derivados de maleimida. La modificación de los restos de lisina es el método más antiguo y más sencillo para marcar proteínas a través de los grupos amino primarios de la lisina. El grupo ϵ -amino de la lisina en la proteína de interés se puede hacer reaccionar fácilmente con ésteres activados, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianato para producir las correspondientes 25 amidas, sulfonamidas, ureas y tioureas (véase p. ej., Takaoka y cols., Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 4088-4106). Aunque son muy eficaces para la bioconjugación, estos métodos químicos inevitablemente tienen como resultado mezclas heterogéneas. Este efecto se hace más pronunciado en moléculas más pequeñas con menos lisinas, por ejemplo en fragmentos de anticuerpo que carecen de región Fc en comparación con las moléculas de tipo IgG. Otros ejemplos de bioconjugación incluyen la conjugación de proteínas fluorescentes, colorantes o el anclaje con 30 moléculas funcionales, por ejemplo, los PEG, porfirinas, péptidos, ácidos peptidonucléicos y fármacos (Takaoka y cols., Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 4088-4106).

La preparación de bioconjugados de proteínas puede implicar diversos niveles de dificultad dependiendo del resultado deseado. Por ejemplo, la bioconjugación puede variar desde la unión simple e inespecífica de 35 polietilenglicol (PEG) a la albúmina sérica (Abuchowski y cols. J. of Biological Chemistry (1977) Vol. 252 (11):3578-3581) hasta la complicada preparación de bioconjugados anticuerpo-fármaco homogéneos.

Este desafío puede abordarse, entre otras técnicas, mediante la aplicación de conjugaciones mediadas por enzima. Por ejemplo, en el documento WO 2014/001325 A1 se describe el uso de sortasa A para la bioconjugación 40 específica de sitio a regiones Fc de un anticuerpo. La sortasa A (SrtA) es la primera proteína integral de la membrana bacteriana descrita en *Staphylococcus aureus*. SrtA cataliza una reacción de transpeptidación que ancla

proteínas a la pared celular bacteriana. Tras el reconocimiento de una señal de direccionamiento LPXTG (X = D, E, A, N, Q o K), una cisteína catalítica escinde el enlace peptídico entre los restos T y G, lo que tiene como resultado la formación de un compuesto intermedio tioacilo. Este compuesto intermedio tioacilo puede reaccionar después con una glicina amino terminal que actúa como nucleófilo. SrtA acepta (oligo)glicina N-terminal como nucleófilo, 5 generando un nuevo enlace peptídico entre las dos moléculas. SrtA funciona en condiciones fisiológicas y se ha utilizado en reacciones de bioconjugación para marcar proteínas por ejemplo con biotina, o para funcionalizar un Fab recombinante específico de HER2 con la citotoxina vegetal gelonina (véase p. ej., Popp y cols. [2011] *Angew Chemie Int. Ed.* 50: 5024-5032; Kornberger y cols. [2014] *mAbs* 6 (2): 354-366). Habitualmente, las proteínas diana se marcan en el carboxilo terminal con el motivo LPXTG seguido por una etiqueta de purificación de modo que la 10 transpeptidación mediada por SrtA elimine la etiqueta de purificación y genere la proteína marcada.

Uno de los principales inconvenientes del uso de SrtA en reacciones de bioconjugación es la alta concentración de enzima que se requiere para catalizar la reacción de la transpeptidasa. Se ha intentado mejorar la cinética de la reacción utilizando la evolución molecular de SrtA que ha dado lugar a un aumento de la afinidad de la enzima por el 15 motivo LPXTG en aproximadamente 140 veces (véase p. ej., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 Jul 12; 108(28): 11399-11404). Otra desventaja del uso de reacciones de bioconjugación mediadas por SrtA es la reversibilidad de las reacciones catalizadas. También se ha intentado aquí superar esta limitación mediante el uso de sustratos de SrtA modificados químicamente LPETGG-isoacil-serina y LPETGG-isoacil-homoserina, que pueden unirse irreversiblemente a restos que contienen glicina aminoterminal mediante la desactivación de fragmentos peptídicos 20 escindidos por SrtA a través de la formación de dicetopeperazinas (véase p. ej., Liu y cols. *J. Org. Chem.* 2014, 79, 487-492).

Otro importante método de bioconjugación mediado por enzima implica el uso de transglutaminasas (TGAs), en particular transglutaminasas microbianas (mTGAs). Las TGAs constituyen una gran familia de enzimas 25 detectadas en varios organismos como mamíferos, invertebrados, plantas y microorganismos. Las transglutaminasas son protein-glutamina γ -glutamiltransferasas (E.C. 2.3.2.13), que normalmente catalizan la transamidación dependiente de pH de restos de glutamina a restos de lisina. La mayoría de las TGAs parecen ser promiscuas con respecto al sustrato de lisina y puede incluso aceptar los grupos 5-aminopentilo como sustitutos de la lisina para servir como donante de grupos amino. Sin embargo, la selectividad de las TGAs para reconocer un 30 resto de glutamina como sustrato parece ser mucho más estricta, ya que para que las TGAs acepten un resto de glutamina, el resto tiene que estar ubicado en una región flexible de la proteína (véase p. ej., Jeger y cols. *Angew. Chem Int. Ed.* 2010, 49, 9995-9997; Fontana y cols. *Adv Drug Deliv Rev.* 3 enero 2008;60(1):13-28).

Las transglutaminasas están ampliamente distribuidas en la mayoría de los tejidos y líquidos corporales y se cree 35 que están implicadas en una gran variedad de funciones fisiológicas. Un ejemplo de reacción mediada por transglutaminasa es la terminación del sangrado durante la coagulación sanguínea por el factor XIIIa, que es una forma activada de transglutaminasa plasmática que cataliza el entrecruzamiento entre moléculas de fibrina (véase p. ej., Griffin y cols. *Biochem. J.* (2002) 368, 377-396). Sin embargo, la función biológica de las transglutaminasas bacterianas sigue siendo en gran medida desconocida. Se ha especulado que la mTGA de *Streptomyces mobaraensis* entrecruza las proteínas inhibidoras durante el desarrollo de esporas e hifas aéreas.

La transglutaminasa de *S. mobaraensis* no muestra homología significativa con las TGAs de mamífero y tiene una

estructura única en comparación con la TG2 humana, que es el miembro mejor caracterizado de la familia de TGasas humanas. A diferencia de su ortólogo de mamífero, la mTG2 de *S. moharaensis* es dependiente de calcio y tiene un peso molecular de tan solo 37,9 kDa, que es aproximadamente la mitad del peso molecular de las mTGases similares al factor XIII. La mTG2 también se caracteriza por una velocidad de reacción más alta que su ortólogo de 5 mamífero. Otro aspecto que ha contribuido al uso extendido de mTG2 es el hecho de que la enzima se puede producir fácilmente en cantidades mayores que una proteína recombinante, lo que, junto con sus propiedades bioquímicas, ha llevado a un uso extendido de mTG2 también en la industria alimentaria (véase p. ej., Sommer y cols. (2011) *Protein Expression and Purification* 77:9-19; Marx y cols. (2008) *Enzyme and Microbial technology* 42:568-575). La mutagénesis aleatoria de mTG2 se ha empleado para aumentar la estabilidad termodinámica de la 10 enzima (véase p. ej., *Journal of Biotechnology* 136 (2008) 156-162). Es de destacar que todas las mutaciones que han dado lugar a un aumento de la estabilidad de mTG2 a temperaturas elevadas se localizan dentro de la región amino terminal de la enzima.

La transglutaminasa microbiana mTG2 también se ha usado para la PEGilación estequiométrica y específica de sitio 15 de proteínas como α -lactoalbúmina, hormona de crecimiento humana e interleuquina-2 o para la modificación estequiométrica y específica de sitio de anticuerpos (véase p. ej., Jeger y cols. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 9995-9997; Fontana y cols. *Adv Drug Deliv Rev.* 3 enero 2008;60(1):13-28). En general, se encontró que el número de glutaminas reactivas era bajo en comparación con el número total de glutaminas expuestas en la superficie.

20 Se encontró que la mTG2, cuando se utiliza para catalizar la transglutaminación en anticuerpos monoclonales nativos completamente glucosilados, no reconoce como sustrato ningún resto de glutamina en el correspondiente anticuerpo monoclonal. Se observó que únicamente los anticuerpos desglucosilados o aglucosilados podían ser reconocidos por la mTG2 como sustratos. Curiosamente, se encontró que solo un resto de glutamina servía como sustrato acilglutamina en los anticuerpos desglucosilados o aglucosilados (Q295). Esto limita en gran medida el uso 25 de mTG2 para la bioconjugación específica de sitio de anticuerpos para la generación de conjugados anticuerpo-fármaco, en particular para su uso en seres humanos. Curiosamente, cuando se utilizó un anticuerpo con mutación en Fc (N297Q), se encontró que este segundo resto glutamina era modificado por la mTG2 con el correspondiente sustrato (Fontana y cols. *Adv Drug Deliv Rev.* 3 enero 2008;60(1):13-28).

30 Una de las proteínas mejor caracterizadas para la PEGilación mediada por mTG es la hormona del crecimiento humana (hGH). Se identificaron dos restos glutamina en la hGH como los principales sitios de conjugación, concretamente Q40 y Q141. La mutagénesis de mTG dio lugar a una variante de mTG con mayor selectividad por Q141. En otro estudio se encontró que, en el caso de la calcitonina de salmón y la hormona de crecimiento humana, se puede utilizar un cambio del solvente que presumiblemente da lugar a un cambio en la estructura secundaria que 35 rodea a la glutamina reactiva para limitar la conjugación a un único resto de glutamina y, de este modo, aumentar la selectividad.

En el caso de la interleuquina-2 humana (hIL-2), se encontró una única glutamina reactiva (Gln74) conjugada con PEG de 12 kDa o glucósidos triantenario terminado en galactosa.

40 Se han utilizado en el pasado secuencias peptídicas artificiales para examinar más en profundidad la especificidad de sustrato de la mTG2. Por ejemplo, los efectos de la secuencia que rodea al resto Gln sustrato se investigó

primero en el contexto del sustrato heptapéptido (GGGQGGG), donde cada glicina se sustituyó individualmente por varios aminoácidos (Ohtsuka y cols. Biosci., Biotechnol., Biochem. 64, 2608-13). Se encontró que los restos hidrófobos en el extremo N-terminal de la Gln aceleró la reacción relativa al péptido GGGQGGG (en las posiciones -3, -2 y -1), sin embargo, la cinética de la reacción general era baja.

- 5 La secuencia sustrato preferida de la mTG también se evaluó usando una biblioteca peptídica de despliegue de fagos utilizando una biblioteca mucho mayor de aproximadamente 10^{11} péptidos lineales. La mayoría de los clones identificados contenían un aminoácido aromático (W, F o Y) en las posiciones -5 a -3, una arginina o resto hidrófobo en las posiciones +1 o +2, y restos hidrófobos en las posiciones -2 y -1 (véase p. ej., Sugimura y cols., Archives of Biochemistry and Biophysics 477 [2008] 379-383).
- 10 El uso de mTG2 para la generación de conjugados anticuerpo-fármaco requiere la bioconjugación de una carga activa funcional con un anticuerpo monoclonal. En los conjugados anticuerpo-fármaco (CAF), el anticuerpo dirige específicamente la captación y liberación de una toxina muy potente en una célula cancerosa, una tecnología que ha captado mucha atención en los últimos años como una nueva opción de tratamiento novedosa y eficaz para pacientes con cáncer.

- 15 Entre los ejemplos de CAF que han recibido la autorización de comercialización se incluyen Kadcyla® (trastuzumab emtansina) y Adcetris® (brentuximab vedotina) para el tratamiento del cáncer de mama metastásico y el linfoma de Hodgkin. Estos anticuerpos, así como otros anticuerpos candidatos que están actualmente en desarrollo clínico, no se han obtenido mediante bioconjugación usando por ejemplo mTG2, pero dependen de métodos de conjugación clínica para su producción que dan lugar a mezclas heterogéneas de anticuerpos con un número variable de moléculas de fármaco unidas a ellos (véase p. ej., Handbook of Therapeutic Antibodies, 2.^a edición, editado por S. Dübel y J.M. Reichert, John Wiley & Sons [2014], pág. 369).

- 20 Se ha demostrado que la heterogeneidad de los CAF puede afectar negativamente a la eficacia del fármaco, en particular si se han conjugado insuficientemente fracciones significativas del material. Los anticuerpos conjugados insuficientemente competirán con los CAF por la unión a la diana, lo que tiene como resultado una menor eficacia de los CAF conjugados correctamente. El aumento de la carga de fármaco en los anticuerpos también puede afectar negativamente a la eficacia del CAF. Los datos han demostrado que los CAF con altas relaciones fármaco:anticuerpo se eliminan más rápidamente de la circulación, lo que tiene como consecuencia una reducción clínica para su producción que dan lugar a mezclas heterogéneas de anticuerpos con un número variable de moléculas de fármaco unidas a ellos (véase p. ej., Handbook of Therapeutic Antibodies, 2.^a edición, editado por S. Dübel y J.M. Reichert, John Wiley & Sons [2014], pág. 369).
- 25 Los estudios con el conjugado anticuerpo monoclonal anti-CD30-auristatina E (MMAE) ha demostrado que los CAF con una estequiometría anticuerpo-fármaco de 1:2-1:4 son más eficaces, siendo más preferible la relación 1:4 (véase p. ej., Hamblett y cols. Clinical Cancer Research (2004) Vol. 10, 7063-7070).

- 30 En el documento WO 2013/092983 se describen métodos de funcionalización de inmunoglobulinas con fármacos que emplean TGasa. Este enfoque describe el método para obtener un nuevo sitio mediante mutagénesis dirigida para generar un donante Q dentro de la cadena pesada del anticuerpo. Este método empírico requiere probar un gran número de mutantes, ya que las reglas que rigen la selección por TGasas de restos de glutamina para su modificación aún se desconocen en gran medida. En consecuencia, el uso de este método para desarrollar nuevos anticuerpos portadores de un donante Q requiere mucho tiempo y es muy costoso.

En el documento WO 2012/059882 además se describen conjugados peptídicos específicos modificados y métodos para hacer dichos conjugados usando transglutaminasas.

En el documento WO 2015/097267 se describen secuencias peptídicas que reaccionan selectivamente como

- 5 donantes de glutamina con la transglutaminasa, como mTG2 de *S. mobaraensis* que puede utilizarse para reacciones de conjugación mediadas por mTG2.

Rachel y cols., BIOMOLECULES, vol. 3, n.º 4, 2013, páginas 870-888 es una revisión de usos biotecnológicos de las transglutaminasas.

- 10 A pesar de los estudios sobre bioconjugación de proteínas con mTG2 y la exploración de nuevos motivos de secuencia que puedan utilizarse como donantes de glutamina para las reacciones de bioconjugación, no se conocen ni las secuencias ni el entorno estructural de los sitios sustrato MTG naturales.

Existe por tanto la necesidad de ampliar el repertorio de sustratos que reconoce la mTG2 para una producción más 15 eficaz de bioconjugados, en particular, para la fabricación de CAF con una estequiometría anticuerpo:fármaco bien definida.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 20 La invención a la cual pertenece la presente especificación se define por las reivindicaciones adjuntas a esta descripción.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que una secuencia donante que contiene acilglutamina derivada de la proteína que induce autolisis dispasa de la cepa 40847 de *Streptomyces mobaraensis* que comprende al menos la secuencia de aminoácidos TYFQAYG puede utilizarse eficazmente en las reacciones de 25 transglutaminación mediada por mTG2.

La memoria descriptiva proporciona una proteína que comprende al menos una secuencia donante de grupos amino que contiene acilglutamina, que está unida covalentemente a través de un enlace γ -glutamilamida a un sustrato que comprende el donante de grupos amino, en el que la al menos una secuencia donante de grupos amino que 30 contiene acilglutamina comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 1 (SEC ID N.º 1 [TYFQAYG]).

Según una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según la presente invención comprende al menos un grupo ϵ -amino, o al menos un tripéptido que contiene la secuencia GGG con un grupo amino primario aminoterminal.

35

En una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención es un resto lisina, un derivado de lisina, un conjugado fármaco-lisina o un polipéptido que comprende al menos un resto lisina.

Según una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según una cualquiera de las 40 realizaciones anteriores de la invención está unido covalentemente a una molécula adicional.

Según una realización, el tripéptido GGG del sustrato que comprende el donante de grupos amino está unido covalentemente a través de su extremo carboxilo a una molécula adicional.

En una realización, la molécula adicional según la invención es un colorante, radioisótopo, fármaco, ribozima, nanocuerpo, enzima o enlazador.

5 En una realización, la molécula adicional según la invención es un enlazador, que es escindible o no escindible.

Según una realización, el enlazador según la invención está acoplado o unido covalentemente a un colorante, radioisótopo o citotoxina.

La proteína de la invención comprende una secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina, que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2 ($X_1X_2X_3TYFQAYGX_4X_5X_6$), donde

- 10 X1 es un aminoácido hidrófobo,
 X2 es un aminoácido cargado negativamente,
 X3 es C o N,
 X4 es C o N,
 X5 es uno de un aminoácido con una cadena lateral polar no cargada, y
15 X6 es un aminoácido cargado negativamente.

En una realización preferida, la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención según una cualquiera de las realizaciones anteriores comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2, donde

- 20 X1 es uno cualquiera de A, V, I, L, M o G,
 X2 es uno de D o E,
 X3 es C,
 X4 es C o N,
25 X5 es S, T o N,
 X6 es uno de D o E.

Según una realización preferida, la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2, donde

- 30 X1 es uno cualquiera de A, V, I, L, M o G,
 X2 es uno de D o E,
 X3 es C,
 X4 es C,
35 X5 es S, T o N,
 X6 es uno de D o E.

Según una realización más preferida, la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2, donde

X1 es uno cualquiera de A, V, I, L, M o G,

X2 es E,

X3 es C,

X4 es C,

5 X5 es T, y

X6 es E.

Según una realización aún más preferida, la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 90.

10 En una realización, la proteína según la invención es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, dominio Fc, enzima o una estructura no inmunoglobulina.

En una realización, la proteína según la invención es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo bivalente, VHH, Fab, F(ab)₂ o scFv.

15 Según una realización preferida, la proteína según la invención es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado o fragmento del mismo.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para acoplar covalentemente un sustrato que comprende un donante de grupos amino de la invención a un donante de aminoácidos que contiene acilglutamina que comprende una secuencia polipeptídica según la SEC ID N.º 2, en el que el método comprende los pasos de:

20 • poner en contacto un sustrato que comprende un donante de grupos amino según la invención y un donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención en presencia de transglutaminasa, preferiblemente mTG2, para obtener una proteína de la invención según una cualquiera de las realizaciones anteriores.

25 En una realización, el donante de aminoácidos que contiene acilglutamina del método de la invención es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, enzima o una estructura no inmunoglobulina.

Según una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino del método de la invención está acoplado o unido covalentemente a un colorante, fármaco, ribozima, nanocuerpo, enzima o enlazador.

30 Según una realización de la invención, el enlazador es escindible o no escindible y está acoplado a un colorante, radioisótopo o citotoxina.

En una realización, la presente invención proporciona una proteína que se puede obtener mediante el método de la invención como se describe en este documento.

35 En una realización, la presente invención proporciona el uso de una secuencia polipeptídica según una cualquiera de la SEC ID N.º 2 en el método de la invención según una cualquiera de las realizaciones como se describe en este documento.

Según una realización, la presente invención proporciona una proteína que comprende el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2.

En una realización, la presente invención proporciona un polipéptido según la SEC ID N.º 2.

En una realización, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica según la SEC ID N.º 2 de la invención.

En una realización, la presente invención proporciona un vector que comprende el polipéptido que codifica la secuencia polipeptídica según la SEC ID N.º 2.

- 5 En una realización, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende el polinucleótido de la invención o un vector según la invención como se describe en este documento.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, anticuerpo bivalente o anticuerpo VHH según la invención que comprende al menos una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2.

- 10 En consecuencia, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, anticuerpo bivalente o anticuerpo VHH de la invención está humanizado o es humano.

En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención como se describe anteriormente es un anticuerpo monoclonal humanizado o humano.

- 15 En una realización preferida, el anticuerpo de la invención como se describe anteriormente es un anticuerpo de tipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM.

En una realización, el anticuerpo de la invención según se describe anteriormente está acoplado covalentemente a al menos un enlazador como se describe anteriormente según el método de la invención como se describe anteriormente.

- 20 Según una realización, el al menos un enlazador del anticuerpo monoclonal de la invención está además acoplado a un colorante, radioisótopo o citotoxina.

En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal de la invención como se describe en este documento se une específicamente a antígenos de la superficie de células cancerosas.

En una realización más preferida, el anticuerpo monoclonal de la invención como se describe anteriormente es el anticuerpo monoclonal c225 (cetuximab).

- 25 En una realización más preferida, el anticuerpo de la invención como se describe en este documento es para su uso en el tratamiento del cáncer, más preferiblemente, el anticuerpo de la invención como se describe anteriormente es para su uso en el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer pancreático, preferiblemente cáncer colorrectal, metastásico (CCRm), metástasis hepáticas irresecables, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC).

Según una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo de la invención y al menos un principio farmacéuticamente activo adicional.

- 35 En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención como se describe en este documento o que comprende la composición según la invención y al menos un principio adicional.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar a un sujeto que lo necesita afectado por el cáncer, en el que el tratamiento comprende la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica según la invención.

5 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Figura 1: a) Conjugación de glutamina (Q) mediada por transglutaminasa con un sustrato donante de grupos amino. b) Secuencia de aminoácidos de una secuencia natural de reconocimiento de transglutaminasa tomada de la proteína sustrato DAIP (1) y secuencias modificadas (2) y (3) utilizadas en este estudio para conjugación. c) Representación esquemática del diseño de una secuencia de reconocimiento de transglutaminasa modificada (etiqueta MTG) que imita el bucle Q298 funcional en DAIP.

Figura 2: Conjugación mediada por MTG de péptidos modelo modificados y anticuerpos monoclonales de longitud completa. a) Los péptidos modelo modificados 2 y 3 que contienen un motivo de reconocimiento de transglutaminasa se biotinilaron en una reacción catalizada por MTG con monobiotinilcadaverina (4, MBC). b) Cinética de biotinilación que compara el péptido restringido conformacionalmente 2 (○) (p. ej., con un péptido de la invención según la SEC ID N.º 4) con un péptido lineal 3 (●) (p. ej., con los péptidos de la invención según la SEC ID N.º 3 o la SEC ID N.º 5). Las barras de error que representan la desviación estándar se calcularon a partir de triplicados. 15 Análisis en gel SDS-PAGE e inmunotransferencia de variantes biotiniladas de cetuximab con etiquetas MTG C-terminales (9: con etiqueta MTG de la invención según la SEC ID N.º 90; 10: con etiqueta MTG de la invención según la SEC ID N.º 246). La biotinilación se visualizó usando el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina y NBT/BCIP (panel derecho). d) Cuadro general de las 20 variantes de cetuximab con etiquetas MTG C-terminales utilizadas para la biotinilación favorecida por MTG (7 y 8) y los correspondientes anticuerpos conjugados (9 y 10).

Figura 3: Unión de cetuximab biotinilado estudiado en ensayos celulares y mediante citometría de flujo. a) 30 Ensayos celulares de unión de las variantes de cetuximab biotiniladas 9 y 10 comparadas con cetuximab wt usando células EBC-1 EGFR positivas y células CHO-K1 EGFR negativas (+MTG rx., paneles central e inferior). Las células se montaron usando ProLong® Diamond Antifade Mountant con DAPI (azul) y la biotinilación se visualizó mediante el marcaje con estreptavidina-AF488 (verde). Las células se escanearon usando un microscopio confocal. Se muestran las imágenes combinadas con contraste de interferencia diferencial (DIC). b) Citometría de flujo de las 35 células EBC-1 EGFR positivas incubadas con las variantes biotiniladas de cetuximab 9. Las células unidas a cetuximab biotinilado se marcaron con fluorescencia mediante la adición del conjugado estreptavidina Alexa Fluor® 488.

Figura 4: Análisis por HPLC de fase inversa de la biotinilación favorecida por transglutaminasa del péptido 40 oxidado 2 (gradiente del 10 al 80 %). Se analizaron las áreas de los picos de 2 y 5 y se restó el fondo.

Figura 5: Análisis en gel SDS-PAGE 15 % teñido con Coomassie de cetuximab natural purificado (carril 1) y

variantes de cetuximab 7 y 8 (p. ej., la variante 7 corresponde a cetuximab según la invención que se ha fusionado en el extremo carboxilo terminal a la SEC ID N.º 90 y bloqueado o restringido por un puente disulfuro, y variantes que corresponden a cetuximab fusionado en el extremo carboxilo terminal a la SEC ID N.º 246 sin la formación de puentes disulfuro y sin restricción conformacional. 5 Los anticuerpos se redujeron en presencia de 2-mercaptopetanol antes de la carga en el gel (2 µg/carril). Los marcadores de peso molecular preteñidos (New England Biolabs) indican los tamaños de las proteínas en kDa.

- Figura 6: Experimento de control de la conjugación de cetuximab mediada por transglutaminasa. **a)** Análisis en gel SDS-PAGE 15 % teñido con Coomassie de la conjugación mediada por transglutaminasa de cetuximab natural con monobiotinilcadaverina (MBC) en presencia de concentraciones crecientes del tensioactivo aniónico N-laurilsarcosina (LS), un agente que se ha descrito libera las endoglutaminas ocultas de las proteínas haciéndolas accesibles a la transglutaminasa. **b)** Análisis mediante inmunotransferencia de la conjugación mediada por transglutaminasa de cetuximab natural con monobiotinilcadaverina (MBC) en presencia de concentraciones crecientes del tensioactivo aniónico N-laurilsarcosina (LS). La biotinilación se detectó usando el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina y NBT/BCIP. Los marcadores de peso molecular preteñidos (New England Biolabs) indican los tamaños de las proteínas en kDa. 10
- Figura 7: Representación esquemática de una cadena pesada de 10 utilizada para la digestión tríptica antes del análisis mediante EM MALDI. 15
- Figura 8: Espectro de EM MALDI-TOF de la cadena pesada de 10 digerida con tripsina. 20
- Figura 9: Espectro de EM MALDI-TOF de la cadena pesada de 10 digerida con tripsina en detalle. 25
- Figura 10: **(A)** Se analizaron los péptidos derivados de la digestión con tripsina utilizando la herramienta de bioinformática GPMAW. Los péptidos modificados mediante carbamidometilo (CAM) en restos de cisteína o monobiotinilcadaverina (MBC) en restos de glutamina están subrayados en color cian y los péptidos identificados sin modificaciones están subrayados en color magenta. **(B)** Análisis estadístico de la cobertura de restos que indica que se consiguió una cobertura del 56 % de los restos. 30
- Figura 11: Análisis en gel de SDS-PAGE de cetuximab sin modificar (*wild-type*, wt) y variantes 9 y 10 comparando anticuerpos con lisina C-terminal de la secuencia wt de cetuximab (+K447) y anticuerpos que les falta esta lisina C-terminal (-K447). El entrecruzamiento intramolecular catalizado por MTG se ha observado en experimentos preliminares entre las etiquetas MTG y el resto de Lys C-terminal de la secuencia wt de cetuximab (+K447). Este entrecruzamiento pudo suprimirse completamente omitiendo esta lisina (-K447). 35
- Figura 12: Determinación de la eficacia de la conjugación de anticuerpos mediante el análisis de TAMRA-cadaverina y fluorescencia. 40

Figura 13: Determinación de tioles libres en los anticuerpos 7 y 8 mediante el reactivo de Ellman.

Figura 14: (A) Inmunotransferencia usando estreptavidina-AP, NBT/BCIP para la detección de cetuximab biotinilado. Las flechas indican la posición de cetuximab (biotinilado) y de mTG2. (B) Gel de proteínas teñido con Coomassie con los carriles cargados como se indica. (C) Lectura de fluorescencia para la detección de cetuximab que comprende la etiqueta MTG 1 (SEC ID N.º 90) o la etiqueta MTG 2 (SEC ID N.º 246) conjugado a sustratos donantes de grupos amino fluorescentes GGG-TAMRA o TAMRA-cadaverina.

Figura 15: Cargas activas citotóxicas con diferentes aminas primarias utilizadas en las reacciones de conjugación mediada por transglutaminasa. (1) Monometil auristatina E (MMAE) con enlazador polietilenglicol (PEG) no escindible y grupo amino primario, (2) monometil auristatina E (MMAE) con enlazador valina-citrulina-p-aminobencilcarbamato (vc-PABC) escindible, espaciador PEG y amina primaria, (3) monometil auristatina E (MMAE) con enlazador valina-citrulina-p-aminobencilcarbamato (vc-PABC) escindible y grupo amino alifático, (4) monometil auristatina F (MMAF) con enlazador valina-citrulina-p-aminobencilcarbamato (vc-PABC) escindible y grupo amino alifático.

Figura 16: Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de conjugados anticuerpo-fármaco (CAF) sintetizados mediante catálisis de la transglutaminasa microbiana (MTG). Los CAF se generaron mediante conjugación mediada por enzima de las cargas activas citotóxicas 1-4 como se muestra en la figura 15 a un anticuerpo IgG1 (cetuximab) con una etiqueta MTG en el extremo carboxilo terminal en cada una de sus cadenas pesadas. (A) Blanco, (B) anticuerpo sin conjugar de control, (C) CAF con una relación fármaco-anticuerpo (RFA) diferente obtenidos mediante conjugación a la carga activa 1, (D) CAF con una relación fármaco-anticuerpo (RFA) diferente obtenidos mediante conjugación a la carga activa 2, (E) CAF con una relación fármaco-anticuerpo (RFA) diferente obtenidos mediante conjugación a la carga activa 3, (F) CAF con una relación fármaco-anticuerpo (RFA) diferente obtenidos mediante conjugación a la carga activa 4.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID N.º 1	TYFQAYG
SEC ID N.º 2	X ₁ X ₂ X ₃ TYFQAYG X ₄ X ₅ X ₆
SEC ID N.º 3	X ₁ X ₂ C TYFQAYG NX ₅ X ₆
SEC ID N.º 4	X ₁ X ₂ C TYFQAYG CX ₅ X ₆
SEC ID N.º 5	X ₁ X ₂ N TYFQAYG NX ₅ X ₆
SEC ID N.º 6	X ₁ X ₂ N TYFQAYG CX ₅ X ₆
SEC ID N.º 7	ADC TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 8	VDC TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 9	IDC TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 10	LDC TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 11	MDC TYFQAYG CSD

SEC ID N.º 12	GDC TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 13	AEC TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 14	VEC TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 15	IEC TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 16	LEC TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 17	MEC TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 18	GEC TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 19	ADC TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 20	VDC TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 21	IDC TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 22	LDC TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 23	MDC TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 24	GDC TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 25	AEC TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 26	VEC TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 27	IEC TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 28	LEC TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 29	MEC TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 30	GEC TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 31	ADC TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 32	VDC TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 33	IDC TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 34	LDC TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 35	MDC TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 36	GDC TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 37	AEC TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 38	VEC TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 39	IEC TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 40	LEC TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 41	MEC TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 42	GEC TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 43	ADC TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 44	VDC TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 45	IDC TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 46	LDC TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 47	MDC TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 48	GDC TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 49	AEC TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 50	VEC TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 51	IEC TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 52	LEC TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 53	MEC TYFQAYG NSE

SEC ID N.º 54	GEC TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 55	ADC TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 56	VDC TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 57	IDC TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 58	LDC TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 59	MDC TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 60	GDC TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 61	AEC TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 62	VEC TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 63	IEC TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 64	LEC TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 65	MEC TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 66	GEC TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 67	ADC TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 68	VDC TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 69	IDC TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 70	LDC TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 71	MDC TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 72	GDC TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 73	AEC TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 74	VEC TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 75	IEC TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 76	LEC TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 77	MEC TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 78	GEC TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 79	ADC TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 80	VDC TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 81	IDC TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 82	LDC TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 83	MDC TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 84	GDC TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 85	AEC TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 86	VEC TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 87	IEC TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 88	LEC TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 89	MEC TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 90	GEC TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 91	ADC TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 92	VDC TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 93	IDC TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 94	LDC TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 95	MDC TYFQAYG NTE

SEC ID N.º 96	GDC TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 97	AEC TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 98	VEC TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 99	IEC TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 100	LEC TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 101	MEC TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 102	GEC TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 103	ADC TYFQAYG CND
SEC ID N.º 104	VDC TYFQAYG CND
SEC ID N.º 105	IDC TYFQAYG CND
SEC ID N.º 106	LDC TYFQAYG CND
SEC ID N.º 107	MDC TYFQAYG CND
SEC ID N.º 108	GDC TYFQAYG CND
SEC ID N.º 109	AEC TYFQAYG CND
SEC ID N.º 110	VEC TYFQAYG CND
SEC ID N.º 111	IEC TYFQAYG CND
SEC ID N.º 112	LEC TYFQAYG CND
SEC ID N.º 113	MEC TYFQAYG CND
SEC ID N.º 114	GEC TYFQAYG CND
SEC ID N.º 115	ADC TYFQAYG NND
SEC ID N.º 116	VDC TYFQAYG NND
SEC ID N.º 117	IDC TYFQAYG NND
SEC ID N.º 118	LDC TYFQAYG NND
SEC ID N.º 119	MDC TYFQAYG NND
SEC ID N.º 120	GDC TYFQAYG NND
SEC ID N.º 121	AEC TYFQAYG NND
SEC ID N.º 122	VEC TYFQAYG NND
SEC ID N.º 123	IEC TYFQAYG NND
SEC ID N.º 124	LEC TYFQAYG NND
SEC ID N.º 125	MEC TYFQAYG NND
SEC ID N.º 126	GEC TYFQAYG NND
SEC ID N.º 127	ADC TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 128	VDC TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 129	IDC TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 130	LDC TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 131	MDC TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 132	GDC TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 133	AEC TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 134	VEC TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 135	IEC TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 136	LEC TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 137	MEC TYFQAYG CNE

SEC ID N.º 138	GEC TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 139	ADC TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 140	VDC TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 141	IDC TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 142	LDC TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 143	MDC TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 144	GDC TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 145	AEC TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 146	VEC TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 147	IEC TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 148	LEC TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 149	MEC TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 150	GEC TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 151	ADN TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 152	VDN TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 153	IDN TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 154	LDN TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 155	MDN TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 156	GDN TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 157	AEN TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 158	VEN TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 159	IEN TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 160	LEN TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 161	MEN TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 162	GEN TYFQAYG CSD
SEC ID N.º 163	ADN TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 164	VDN TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 165	IDN TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 166	LDN TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 167	MDN TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 168	GDN TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 169	AEN TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 170	VEN TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 171	IEN TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 172	LEN TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 173	MEN TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 174	GEN TYFQAYG NSD
SEC ID N.º 175	ADN TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 176	VDN TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 177	IDN TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 178	LDN TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 179	MDN TYFQAYG CSE

SEC ID N.º 180	GDN TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 181	AEN TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 182	VEN TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 183	IEN TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 184	LEN TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 185	MEN TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 186	GEN TYFQAYG CSE
SEC ID N.º 187	ADN TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 188	VDN TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 189	IDN TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 190	LDN TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 191	MDN TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 192	GDN TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 193	AEN TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 194	VEN TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 195	IEN TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 196	LEN TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 197	MEN TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 198	GEN TYFQAYG NSE
SEC ID N.º 199	AND TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 200	VDN TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 201	IDN TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 202	LDN TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 203	MDN TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 204	GDN TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 205	AEN TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 206	VEN TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 207	IEN TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 208	LEN TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 209	MEN TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 210	GEN TYFQAYG CTD
SEC ID N.º 211	ADN TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 212	VDN TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 213	IDN TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 214	LDN TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 215	MDN TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 216	GDN TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 217	AEN TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 218	VEN TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 219	IEN TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 220	LEN TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 221	MEN TYFQAYG NTD

SEC ID N.º 222	GEN TYFQAYG NTD
SEC ID N.º 223	ADN TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 224	VDN TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 225	IDN TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 226	LDN TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 227	MDN TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 228	GDN TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 229	AEN TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 230	VEN TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 231	IEN TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 232	LEN TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 233	MEN TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 234	GEN TYFQAYG CTE
SEC ID N.º 235	ADN TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 236	VDN TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 237	IDN TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 238	LDN TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 239	MDN TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 240	GDN TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 241	AEN TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 242	VEN TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 243	IEN TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 244	LEN TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 245	MEN TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 246	GEN TYFQAYG NTE
SEC ID N.º 247	ADN TYFQAYG CND
SEC ID N.º 248	VDN TYFQAYG CND
SEC ID N.º 249	IDN TYFQAYG CND
SEC ID N.º 250	LDN TYFQAYG CND
SEC ID N.º 251	MDN TYFQAYG CND
SEC ID N.º 252	GDN TYFQAYG CND
SEC ID N.º 253	AEN TYFQAYG CND
SEC ID N.º 254	VEN TYFQAYG CND
SEC ID N.º 255	IEN TYFQAYG CND
SEC ID N.º 256	LEN TYFQAYG CND
SEC ID N.º 257	MEN TYFQAYG CND
SEC ID N.º 258	GEN TYFQAYG CND
SEC ID N.º 259	ADN TYFQAYG NND
SEC ID N.º 260	VDN TYFQAYG NND
SEC ID N.º 261	IDN TYFQAYG NND
SEC ID N.º 262	LDN TYFQAYG NND
SEC ID N.º 263	MDN TYFQAYG NND

SEC ID N.º 264	GDN TYFQAYG NND
SEC ID N.º 265	AEN TYFQAYG NND
SEC ID N.º 266	VEN TYFQAYG NND
SEC ID N.º 267	IEN TYFQAYG NND
SEC ID N.º 268	LEN TYFQAYG NND
SEC ID N.º 269	MEN TYFQAYG NND
SEC ID N.º 270	GEN TYFQAYG NND
SEC ID N.º 271	ADN TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 272	VDN TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 273	IDN TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 274	LDN TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 275	MDN TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 276	GDN TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 277	AEN TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 278	VEN TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 279	IEN TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 280	LEN TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 281	MEN TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 282	GEN TYFQAYG CNE
SEC ID N.º 283	ADN TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 284	VDN TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 285	IDN TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 286	LDN TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 287	MDN TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 288	GDN TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 289	AEN TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 290	VEN TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 291	IEN TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 292	LEN TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 293	MEN TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 294	GEN TYFQAYG NNE
SEC ID N.º 295	GGGSLLQG
SEC ID N.º 296	5'-TGGCTGAACGGCAAAGAGTAC
SEC ID N.º 297	5'-CCTGAAAGTAGGTGCACTGCCGCCAGGGCTCAGGGACAG
SEC ID N.º 298	5'-CGGGGGATCCTCATTGGTGCAGCCGTAGGCCTGAAAGTAGGTGCACTCG
SEC ID N.º 299	5'-CTGAAAGTAGGTGTTCTGCCGCCAGGGCTCAGGGACAG
SEC ID N.º 300	5'-CGGGGGATCCTCATTGGTATTGCCGTAGGCCTGAAAGTAGGTGTTCTCG
SEC ID N.º 301	5'-NNN ₁ NNN ₂ NNN ₃ ACNTAYTTYCARGCNTAYGGN NNN ₄ NNN ₅ NNN ₆
SEC ID N.º 302	LPXTG, con X=D, E, A, N, Q o K
SEC ID N.º 303	GGGYK

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Aunque la presente invención se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos en particular descritos en este documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito únicamente de describir realizaciones en particular y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada

- 5 exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto en la materia.

A continuación se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con

- 10 realizaciones específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. No debe interpretarse que los ejemplos y las realizaciones preferidas descritos de modo diverso limitan la presente invención solo a las realizaciones descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción apoya y abarca realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos descritos y/o preferidos. Asimismo, cualquier permutación y
15 combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud debe considerarse revelada por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique otra cosa.

A través de esta especificación y las reivindicaciones que le siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que el término «comprender», y variaciones como «comprende» y «comprendiendo», implica la inclusión

- 20 de un miembro especificado, entero o en fases, pero no la exclusión de cualquier otro miembro no especificado, entero o en fases. El término «constar de» es una realización particular del término «comprender», en el que se excluye cualquier otro miembro no especificado, entero o en fases. En el contexto de la presente invención, el término «comprender» abarca el término «constar de».

- 25 Se debe interpretar que los términos «un/una» y «el/la» y referencias similares usadas en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el plural como el singular, a menos que se indique otra cosa en este documento o lo contradiga claramente el contexto. La relación de intervalos de valores en este documento pretende simplemente servir como un método abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor independiente que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se
30 indique otra cosa en este documento, cada valor individual se incorpora dentro de la especificación como si se enumerara individualmente en este documento. Ningún texto de la especificación debe interpretarse como que indica algún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

- 35 A lo largo del texto de esta especificación se citan varios documentos. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a preceder a dicha memoria descriptiva en virtud de la invención previa.

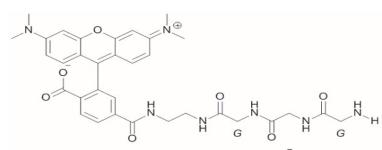
- Los objetivos descritos se resuelven por la presente invención como se define por el contenido de las reivindicaciones adjuntas. La memoria descriptiva se refiere a una proteína que comprende al menos una secuencia
40 donante de aminoácidos que contiene acilglutamina, que está unida covalentemente a través de un enlace γ -glutamilamida a un sustrato que comprende el donante de grupos amino, en el que al menos una secuencia donante de grupos amino que contiene acilglutamina comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 1 (SEC

ID N.º 1 [TYFQAYG]). La memoria descriptiva proporciona una proteína que comprende al menos una, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, preferiblemente 1-6 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6), más preferiblemente 1-4 (p. ej., 1, 2, 3, 4) secuencias donantes de aminoácidos que contienen acilglutamina, en la que la al menos una secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina está unida covalentemente a través de un enlace γ -glutamilamida a un sustrato que comprende un donante de grupos amino y en la que la al menos una secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina comprende al menos la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 1 (TYFQAYG). El término «secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina» se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 7 aminoácidos de longitud, por ejemplo, al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos de longitud y que comprende al menos la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 1. La secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina puede, por ejemplo, además de la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 1 comprender aminoácidos naturales o no naturales, o derivados de aminoácidos naturales. Por ejemplo, la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos no naturales o derivados de aminoácidos naturales.

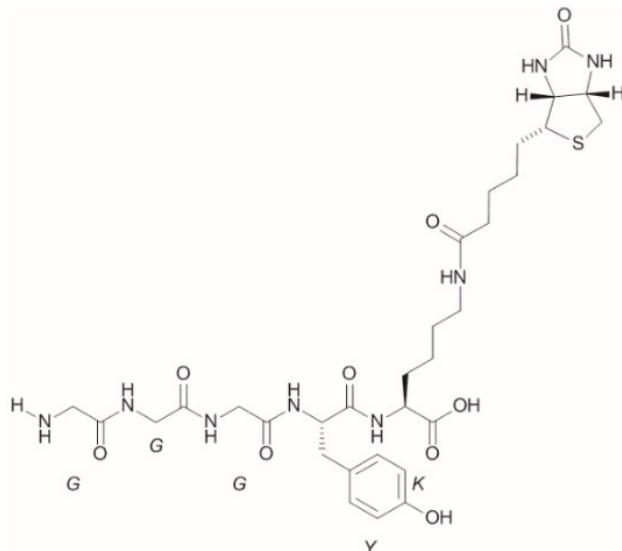
Por ejemplo, los aminoácidos no naturales que puede comprender la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina pueden incluir: azidonorleucina, 3-(1-naftil)alanina, 3-(2-naftil)alanina, p-eticil-fenilalanina, p-propargil-oxi-fenilalanina, m-eticil-fenilalanina, 6-eticil-triptófano, 5-eticil-triptófano, ácido (R)-2-amino-3-(4-eticil-1H-pirrol-3-il)propanoico, p-bromofenilalanina, p-iodofenilalanina, p-azidofenilalanina, 3-(6-cloroindolil)alanina, 3-(6-bromoindolil)alanina, 3-(5-bromoindolil)alanina, azidohomoalanina y p-clorofenilalanina. Por ejemplo, los derivados de aminoácidos naturales pueden incluir: 4-hidroxiprolina, ϵ -N,N,N-trimetillisina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, O-fosferina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N-acetillisina, ω -N-metilarginina, N-acetilserina, N,N,N-trimetilalanina.

El término «enlace γ -glutamilamida» según la invención se refiere a un enlace isopeptídico, por ejemplo, un enlace amida, que no forma parte de la estructura de enlaces peptídicos del correspondiente polipeptido o proteína, que se forma entre el carbono gamma del resto glutamilo de la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina y una amina primaria (1.^a) del sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención.

Según una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención comprende al menos un grupo ϵ -amino o al menos un tripeptido que contiene la secuencia GGG con un grupo amino primario aminoterminal. Por ejemplo, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención puede ser lisina, como L-lisina, o un derivado de lisina, o miméticos estructurales de la misma, como por ejemplo, ácido diaminobutírico (DAB), ácido 2,3-diaminopropanoico, ácido (2S)-2,8-diaminoctanoico, ornitina, tialisina, 1,5-diaminopentano o N-(biotinil)cadaverina. El sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención puede comprender también por ejemplo derivados de lisina que se han acoplado a un colorante (p. ej., TAMRA o colorantes Alexa-Fluor®) u otras moléculas como por ejemplo, biotina. El sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención puede ser también por ejemplo un tripeptido GGG, que puede además por ejemplo estar acoplado a un colorante o molécula, como TAMRA-etilendiamina o biotina, por ejemplo:



o por ejemplo:



En una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención puede incluir también por ejemplo polipéptidos que comprenden al menos un resto de lisina.

Según una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención está unido covalentemente a una molécula adicional. Por ejemplo, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención como se describe anteriormente, como por ejemplo el tripéptido como se describe anteriormente, puede estar unido covalentemente a una molécula adicional, preferiblemente a través de su extremo carboxilo terminal. Por ejemplo, la molécula adicional puede estar unida covalentemente a través de un enlace peptídico, un enlace isopeptídico o cualquier otro enlace covalente, como por ejemplo, un enlace disulfuro.

Según una realización, la molécula adicional según la invención como se describe anteriormente es un colorante, radioisótopo, fármaco, ribozima, nanocuerpo, enzima o enlazador. Por ejemplo, un colorante que puede estar unido covalentemente al sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención puede ser un fluoróforo. En consecuencia, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención puede estar unido covalentemente a un fluoróforo. El término «fluoróforo» como se usa en la presente invención se refiere a un compuesto químico que cuando se excita por exposición a una longitud de onda de luz particular emite luz a una longitud de onda diferente, por ejemplo, los fluoróforos que pueden unirse covalentemente al sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención pueden incluir 1,8-ANS, 4-metilumbelifera, 7-amino-4-metilcumarina, 7-hidroxi-4-metilcumarina, acridina, Alexa Fluor 350™, Alexa Fluor 405™, AMCA, AMCA-X, ATTO Rho6G, ATTO Rho11, ATTO Rho12, ATTO Rho13, ATTO Rho14, ATTO Rho101, Pacific Blue, Alexa Fluor 430™, Alexa Fluor 480™, Alexa Fluor 488™, BODIPY 492/515, Alexa Fluor 532™, Alexa Fluor 546™, Alexa Fluor 555™, Alexa Fluor 594™, BODIPY 505/515, Cy2, cyQUANT GR, FITC, Fluo-3, Fluo-4, GFP (EGFP), mHoneydew, Oregon Green™ 488, Oregon Green™ 514, EYFP, DsRed, DsRed2, dTomato, Cy3.5, ficoeritrina (PE), rojo rodamina, mTangerine, mStrawberry, mOrange, mBanana, tetrametilrodamina (TRITC), R-ficoeritrina, ROX, DyLight 594, Calcium Crimson, Alexa Fluor 594™, Alexa Fluor 610™, Texas Red, mCherry, mKate, Alexa Fluor 660™, Alexa Fluor 680™, aloficianina, DRAQ-5, carboxinaftofluoresceína, C7, DyLight 750, Cellvue NIR780, DM-NERF, eosina, eritrosina, fluoresceína, FAM, hidroxicumarina, IRDyes (IRD40, IRD 700, IRD 800), JOE, rodamina B Lissamine, Marina Blue, metoxicumarina, naftofluoresceína, PyMPO, 5-carboxi-4',5'-dcloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, 5-carboxi-

2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína, 5-carboxifluoresceína, 5-carboxirodamina, 6-carboxirodamina, 6-carboxitetrametilamino, Cascade Blue, Cy2, Cy3, Cy5,6-FAM, cloruro de dansilo, HEX, 6-JOE, NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol), Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, ácido ftálico, ácido tereftálico, ácido isoftálico, violeta de cresilo rápido, violeta azul de cresilo, azul cresilo brillante, ácido para-

- 5 aminobenzoico, eritrosina, ftalocianinas, azometinas, cianinas, xantinas, succinifluoresceínas, criptatos de tierras raras, europio trisbipiridina diamina, criptato o quelato de europio, diamina, dicianinas o colorante La Jolla Blue. Los fluoróforos según la invención pueden incluir, por ejemplo, puntos cuánticos. El término «punto cuántico» como se usa en la presente invención se refiere a un nanocristal esférico único de material semiconductor en el que el radio del nanocristal es menor o igual al tamaño del radio del excitón de Bohr para ese material semiconductor (el valor del 10 radio del excitón de Bohr puede calcularse a partir de los datos encontrados en manuales que contienen información sobre propiedades de semiconductores, como CRC Handbook of Chemistry and Physics, 83.^a ed., Lide, David R. (Editor), CRC Press, Boca Raton, Fla. [2002]). Los puntos cuánticos se conocen en la técnica, como se describen en referencias como Weller, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32: 41-53 (1993), Alivisatos, J. Phys. Chem. 100: 13226-13239 (1996) y Alivisatos, Science 271: 933-937 (1996). Los puntos cuánticos pueden tener, por ejemplo, de 15 aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1000 nm de diámetro, por ejemplo, 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 150 nm, 200 nm, 250 nm, 300 nm, 350 nm, 400 nm, 450 nm o 500 nm, preferiblemente al menos de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 50 nm, más preferiblemente los puntos cuánticos tienen al menos de aproximadamente 2 nm a aproximadamente 20 nm de diámetro (por ejemplo aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nm). Los puntos cuánticos se 20 caracterizan por su tamaño nanométrico sustancialmente uniforme, que tienen con frecuencia aproximadamente del 10 % al 15 % de polidispersión o rango de tamaño. Un punto cuántico es capaz de emitir radiación electromagnética tras su excitación (es decir, el punto cuántico es fotoluminiscente) e incluye un «núcleo» de uno o más materiales semiconductores primeros y puede estar rodeado por una «coraza» de un segundo material semiconductor. Un núcleo de punto cuántico rodeado por una coraza semiconductor se denomina punto cuántico de «núcleo/coraza». 25 El material de la «coraza» circundante tendrá preferiblemente una energía de hueco de banda que es mayor a la energía de hueco de banda del material del núcleo y puede elegirse que tenga una separación atómica próxima a la del sustrato del «núcleo». El núcleo y/o la coraza pueden ser un material semiconductor que incluye, pero sin limitaciones, los materiales del grupo II-VI (ZnS, ZnSe, ZnTe, US, CdSe, CdTe, HgS, HgSe, HgTe, MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe y similares), III-V (GaN, GaP, GaAs, GaSb, InN, InP, 30 InAs, InSb y similares) y IV (Ge, Si y similares), PbS, PbSe y una aleación o una mezcla de los mismos. Los materiales preferidos de la coraza incluyen ZnS. Los puntos cuánticos pueden estar acoplados al enlazador, enzima o proteína de la invención mediante cualquier método conocido en la técnica, como por ejemplo, los métodos descritos en Nanotechnology. 9 diciembre 2011;22(49):494006; Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 84 (2011) 360-368. 35 Según una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino de la invención puede estar unido covalentemente a un radioisótopo, como por ejemplo, ⁴⁷Ca, ¹⁴C, ¹³⁷Cs, ¹⁵⁷Cr, ⁵⁷Co, ⁶⁰Co, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹²⁹I, ¹³¹I, ³²P, ⁷⁵Se, ⁸⁵Sr, ³⁵S, ²⁰¹Th, ³H, preferiblemente, los radioisótopos se incorporan en una molécula adicional, como por ejemplo, un quelante. Los quelantes típicos que pueden usarse por ejemplo como una molécula adicional unida covalentemente al sustrato que comprende el donante de grupos amino de la invención son DPTA, EDTA (ácido 40 etilendiaminetetraacético), EGTA (ácido etilenglicol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N, N,N',N'-tetraacético, NTA (ácido nitrilotriacético), HEDTA (N-(2-hidroxietil)-etilendiamino-N,N',N'-triacético), DTPA (ácido 2-[Bis[2-[bis(carboximetil)amino]-etil]amino]acético) o DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclo-dodecano-1,4,7,10-tetraacético).

Por ejemplo, en una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención puede estar unido covalentemente a un fármaco. El término «fármaco» como se usa en la presente invención se refiere a cualquier compuesto químico o molécula que interfiere con la función fisiológica de una célula, por ejemplo, una célula cancerosa o tumoral. Los fármacos que pueden estar unidos al sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención pueden incluir agentes citostáticos o agentes citotóxicos. Por ejemplo, los agentes citostáticos que pueden usarse para el acoplamiento covalente al sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, inhibidores mitóticos, hormonas o antagonistas de hormonas. Los agentes alquilantes pueden incluir, por ejemplo, busulfán (Myleran), carboplatino (Paraplatin), clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida (Cytoxan), dacarbazina (DTIC-Dome), fosfato de estramustina, ifosfamida, mecloretamina (mostaza nitrogenada), melfalán (mostaza de fenilalanina), procarbazina, tiotepa, mostaza de uracilo; los antimetabolitos pueden incluir, por ejemplo, cladribina, citarabina (arabinósido de citosina), floxuridina (FUDR, 5-fluorodeoxiuridina), fludarabina, 5-fluorouracilo (5FU), gemcitabina, hidroxiurea, 6-mercaptopurina (6MP), metotrexato (ametopterina), 6-tioguanina, pentostatina, pibobroman, tegafur, trimetrexato, glucuronato; los antibióticos pueden incluir, por ejemplo, aclarubicina, bleomicina, dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina, doxorubicina (adriamicina), epirubicina, idarubicina, mitomicina C, mitoxantrona, plicamicina (mitramicina); o los inhibidores mitóticos pueden incluir, por ejemplo, etopósido (VP-16, VePesid), tenipósido (VM-26, Vumon), vinblastina, vincristina, vindesina, hormonas, o los antagonistas de hormonas que se puede usar incluyen, por ejemplo, buserelina, estrógeno equino conjugado (Premarin), cortisona, clorotrianseneno (Tace), dexametasona (Decadron), dietilestilbestrol (DES), etinilestradiol (Estinyl), fluoximesterona (Halotestin), flutamida, acetato de goserelina (Zoladex), caproato de hidroxiprogesterona (Delalutin), leuprolida, acetato de medroxiprogesterona (Provera), acetato de megestrol (Megace), prednisona, tamoxifeno (Nolvadex), testolactona (Teslac), testosterona. Se conocen en la técnica previa compuestos citostáticos o antineoplásicos como los descritos anteriormente y pueden encontrarse, por ejemplo, en D. S. Fischer & T. M. Knobf (1989), The cancer chemotherapy handbook (3.^a ed.). Chicago: Year Book Medical and Association of Community Cancer Centers (Spring, 1992), Compendia-based drug bulletin, Rockville, MD.

Por ejemplo, en una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención puede estar unido covalentemente a una enzima, como por ejemplo L-asparaginasa.

Según una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención puede estar unido covalentemente, por ejemplo, a una ribozima o nanocuerpo. El término «ribozima» como se usa en la presente invención se refiere a una molécula de ARN enzimáticamente activa que tiene actividad de transayuste y actividad de autoayuste. Para los fines de la presente invención, la ribozima puede servir para inhibir la actividad del gen específico de cáncer mediante una reacción de transayuste, por lo que exhibe un efecto antineoplásico selectivo. Se puede usar cualquier ribozima en la presente invención, siempre que pueda inactivar un gen específico de cáncer y activar el gen terapéutico para el cáncer.

En una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención puede estar unido covalentemente, por ejemplo, a un nanocuerpo. Como se usa en este documento, el término «nanocuerpo» se refiere a un anticuerpo que comprende un dominio variable único pequeño, como por ejemplo, VHH de anticuerpos obtenidos de camélidos y dromedarios, por ejemplo, *Camelus baclrianus* y *Calelus dromaderius* que incluyen miembros del nuevo mundo como las especies de llama (*Lama paccos*, *Lama glama* y *Lama vicugna*). Los anticuerpos de las especies se han caracterizado con respecto al tamaño, complejidad estructural y antigenicidad en sujetos humanos. Determinados anticuerpos IgG de esta familia de mamíferos como se encuentran en la naturaleza,

carecen de cadenas ligeras y, por tanto, estructuralmente se pueden diferenciar de la estructura cuaternaria de cuatro cadenas típica que contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, de los anticuerpos de otros animales (véase p. ej., el documento WO94/04678, Hamers-Casterman C, *Nature* 363: 446-448; Harmsen (2007) *Appl Microb Biotechnol* 77: 13-22).

- 5 Según una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino de la invención puede estar unido covalentemente, por ejemplo, a un enlazador. El término «enlazador» o «péptido enlazador» se refiere a una secuencia de aminoácidos sintética o artificial que conecta o enlaza dos moléculas, como por ejemplo, dos secuencias polipeptídicas que enlazan dos dominios polipeptídicos o, por ejemplo, una proteína y un fármaco citostático o toxina. El término «sintético» o «artificial» como se usa en la presente invención se refiere a secuencias
10 de aminoácidos que no son naturales.

Según una realización, el enlazador que se une covalentemente al sustrato que contiene el donante de grupos amino de la invención es escindible o no escindible. El término «escindible» como se usa en la presente invención se refiere a enlazadores que pueden ser escindidos por proteasas, ácidos o mediante reducción de un enlace disulfuro (p. ej., mediado por glutatión o sensible a glutatión). Por ejemplo, los enlazadores escindibles pueden comprender
15 enlazadores valina-citrulina, enlazadores hidrazona o enlazadores disulfuro. Los enlazadores no escindibles que pueden, por ejemplo, unirse covalentemente al sustrato que comprende el donante de grupos amino de la invención comprende el enlazador maleimidocaproílo a MMAF (mc-MMAF), N-maleimidometilciclohexano-1-carboxilato (MCC) o enlazadores mercapto-acetamidocaproílo.

Según una realización, el enlazador según la invención está acoplado o unido covalentemente a un colorante, radioisótopo o citotoxina. En consecuencia, el enlazador según la invención que está unido covalentemente al sustrato que comprende el donante de grupos amino de la invención puede estar, por ejemplo, acoplado o unido covalentemente a un colorante, radioisótopo o citotoxina. El término «acoplado» como se usa para el enlazador según la invención se refiere al hecho de que el colorante, radioisótopo o toxina está unido no covalentemente a la molécula enlazadora según la invención, por ejemplo, a través de interacciones iónicas o hidrófobas. Por ejemplo, el
25 enlazador puede comprender estreptavidina y el colorante, radioisótopo o citotoxina pueden estar unidos covalentemente a biotina. Por ejemplo, en caso de radioisótopos, el radioisótopo puede estar quelado a uno de los quelantes como se describe anteriormente, que puede estar unido covalentemente a biotina. Alternativamente, el radioisótopo puede estar incorporado, por ejemplo, en la biotina, por ejemplo [8,9-3H]biotina (véase p. ej., Robinson y cols., *J Biol Chem.* 25 mayo 1983;258(10):6660-4).

30 Preferiblemente, el enlazador puede, por ejemplo, estar unido covalentemente a una citotoxina, que puede por ejemplo denominarse también «carga activa» (véase p. ej., Perez y cols. *Drug Discovery Today* Vol 19 (7), julio 2014). Las citotoxinas que son adecuadas para la unión covalente a las moléculas enlazadoras incluyen, por ejemplo, las descritas anteriormente y pueden agruparse en dos clases principales: La primera clase incluye citotoxinas que rompen el ensamblaje de microtúbulos y la segunda clase incluye citotoxinas cuya diana es la
35 estructura del ADN. En consecuencia, las citotoxinas que pueden, por ejemplo, estar unidas covalentemente al enlazador según la invención incluyen doxorubicina, calicheamicina, auristatina, maitansina, duoarmicina y sus análogos, α -amaitina, tubulicina y sus análogos. Se conocen en la técnica métodos para unir covalentemente citotoxinas a enlazadores y pueden, por ejemplo, realizarse según el método descrito en *Mol. Pharmaceutics* 2015, 12, 1813-1835. En consecuencia, el sustrato que comprende el donante de grupos amino de la invención que está
40 acoplado a un enlazador escindible o no escindible como se describe anteriormente y que está además acoplado a

una citotoxina como se describe anteriormente, puede usarse, por ejemplo, en reacciones de bioconjugación mediada por transglutaminasa, preferiblemente, la reacción de bioconjugación está catalizada por mTG2. La reacción de bioconjugación puede incluir, por ejemplo, al menos un sustrato de secuencia donante de aminoácidos que contiene glutamina como se describe anteriormente, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos

- 5 según la SEC ID N.º 1 (TYFQAYG) y un sustrato que comprende el donante de grupos amino en presencia de mTG2 en condiciones que permitan la reacción catalizada por mTG2.

Según la invención, la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2 (X₁X₂X₃ TYFQAYG X₄X₅X₆), donde

X₁ es un aminoácido hidrófobo,

10 X₂ es un aminoácido cargado negativamente,

X₃ es C o N,

X₄ es C o N,

X₅ es un aminoácido con una cadena lateral polar no cargada y X₆ es un aminoácido cargado negativamente.

15

En consecuencia, en la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención X₁ puede comprender uno cualquiera de los aminoácidos A, I, L, M, F, W, Y, V; X₂ puede comprender los aminoácidos D, E; X₃, X₄ pueden ser uno de C o N; X₅ puede ser uno de S, T, N o Q y X₆ puede ser uno de D o E. La secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la memoria descriptiva puede comprender una secuencia de

20 aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N.º 1 a la SEC ID N.º 294, por ejemplo, la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención puede comprender una cualquiera de la SEC ID N.º 2, SEC ID N.º 3, SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 5, SEC ID N.º 6, SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 12, SEC ID N.º 13, SEC ID N.º 14, SEC ID N.º 15, SEC ID N.º 16, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 18, SEC ID N.º 19, SEC ID N.º 20, SEC ID N.º 21, SEC ID N.º 22, SEC ID N.º 23, SEC ID N.º 24, SEC ID N.º 25,

25 SEC ID N.º 26, SEC ID N.º 27, SEC ID N.º 28, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 32, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 35, SEC ID N.º 36, SEC ID N.º 37, SEC ID N.º 38, SEC ID N.º 39, SEC ID N.º 40, SEC ID N.º 41, SEC ID N.º 42, SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 47, SEC ID N.º 48, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 50, SEC ID N.º 51, SEC ID N.º 52, SEC ID N.º 53, SEC ID N.º 54, SEC ID N.º 55, SEC ID N.º 56, SEC ID N.º 57, SEC ID N.º 58, SEC ID N.º 59, SEC ID N.º 60, SEC ID N.º 61, SEC ID N.º 62, SEC ID

30 N.º 63, SEC ID N.º 64, SEC ID N.º 65, SEC ID N.º 66, SEC ID N.º 67, SEC ID N.º 68, SEC ID N.º 69, SEC ID N.º 70, SEC ID N.º 71, SEC ID N.º 72, SEC ID N.º 73, SEC ID N.º 74, SEC ID N.º 75, SEC ID N.º 76, SEC ID N.º 77, SEC ID N.º 78, SEC ID N.º 79, SEC ID N.º 80, SEC ID N.º 81, SEC ID N.º 82, SEC ID N.º 83, SEC ID N.º 84, SEC ID N.º 85, SEC ID N.º 86, SEC ID N.º 87, SEC ID N.º 88, SEC ID N.º 89, SEC ID N.º 90, SEC ID N.º 91, SEC ID N.º 92, SEC ID N.º 93, SEC ID N.º 94, SEC ID N.º 95, SEC ID N.º 96, SEC ID N.º 97, SEC ID N.º 98, SEC ID N.º 99, SEC ID N.º

35 100, SEC ID N.º 101, SEC ID N.º 102, SEC ID N.º 103, SEC ID N.º 104, SEC ID N.º 105, SEC ID N.º 106, SEC ID N.º 107, SEC ID N.º 108, SEC ID N.º 109, SEC ID N.º 110, SEC ID N.º 111, SEC ID N.º 112, SEC ID N.º 113, SEC ID N.º 114, SEC ID N.º 115, SEC ID N.º 116, SEC ID N.º 117, SEC ID N.º 118, SEC ID N.º 119, SEC ID N.º 120, SEC ID N.º 121, SEC ID N.º 122, SEC ID N.º 123, SEC ID N.º 124, SEC ID N.º 125, SEC ID N.º 126, SEC ID N.º 127, SEC ID N.º 128, SEC ID N.º 129, SEC ID N.º 130, SEC ID N.º 131, SEC ID N.º 132, SEC ID N.º 133, SEC ID

40 N.º 134, SEC ID N.º 135, SEC ID N.º 136, SEC ID N.º 137, SEC ID N.º 138, SEC ID N.º 139, SEC ID N.º 140, SEC ID N.º 141, SEC ID N.º 142, SEC ID N.º 143, SEC ID N.º 144, SEC ID N.º 145, SEC ID N.º 146, SEC ID N.º 147, SEC ID N.º 148, SEC ID N.º 149, SEC ID N.º 150, SEC ID N.º 151, SEC ID N.º 152, SEC ID N.º 153, SEC ID N.º

154, SEC ID N.º 155, SEC ID N.º 156, SEC ID N.º 157, SEC ID N.º 158, SEC ID N.º 159, SEC ID N.º 160, SEC ID N.º 161, SEC ID N.º 162, SEC ID N.º 163, SEC ID N.º 164, SEC ID N.º 165, SEC ID N.º 166, SEC ID N.º 167, SEC ID N.º 168, SEC ID N.º 169, SEC ID N.º 170, SEC ID N.º 171, SEC ID N.º 172, SEC ID N.º 173, SEC ID N.º 174, SEC ID N.º 175, SEC ID N.º 176, SEC ID N.º 177, SEC ID N.º 178, SEC ID N.º 179, SEC ID N.º 180, SEC ID N.º 5 181, SEC ID N.º 182, SEC ID N.º 183, SEC ID N.º 184, SEC ID N.º 185, SEC ID N.º 186, SEC ID N.º 187, SEC ID N.º 188, SEC ID N.º 189, SEC ID N.º 190, SEC ID N.º 191, SEC ID N.º 192, SEC ID N.º 193, SEC ID N.º 194, SEC ID N.º 195, SEC ID N.º 196, SEC ID N.º 197, SEC ID N.º 198, SEC ID N.º 199, SEC ID N.º 200, SEC ID N.º 201, SEC ID N.º 202, SEC ID N.º 203, SEC ID N.º 204, SEC ID N.º 205, SEC ID N.º 206, SEC ID N.º 207, SEC ID N.º 208, SEC ID N.º 209, SEC ID N.º 210, SEC ID N.º 211, SEC ID N.º 212, SEC ID N.º 213, SEC ID N.º 214, SEC ID N.º 10 215, SEC ID N.º 216, SEC ID N.º 217, SEC ID N.º 218, SEC ID N.º 219, SEC ID N.º 220, SEC ID N.º 221, SEC ID N.º 222, SEC ID N.º 223, SEC ID N.º 224, SEC ID N.º 225, SEC ID N.º 226, SEC ID N.º 227, SEC ID N.º 228, SEC ID N.º 229, SEC ID N.º 230, SEC ID N.º 231, SEC ID N.º 232, SEC ID N.º 233, SEC ID N.º 234, SEC ID N.º 235, SEC ID N.º 236, SEC ID N.º 237, SEC ID N.º 238, SEC ID N.º 239, SEC ID N.º 240, SEC ID N.º 241, SEC ID N.º 242, SEC ID N.º 243, SEC ID N.º 244, SEC ID N.º 245, SEC ID N.º 246, SEC ID N.º 247, SEC ID N.º 248, SEC ID N.º 15 249, SEC ID N.º 250, SEC ID N.º 251, SEC ID N.º 252, SEC ID N.º 253, SEC ID N.º 254, SEC ID N.º 255, SEC ID N.º 256, SEC ID N.º 257, SEC ID N.º 258, SEC ID N.º 259, SEC ID N.º 260, SEC ID N.º 261, SEC ID N.º 262, SEC ID N.º 263, SEC ID N.º 264, SEC ID N.º 265, SEC ID N.º 266, SEC ID N.º 267, SEC ID N.º 268, SEC ID N.º 269, SEC ID N.º 270, SEC ID N.º 271, SEC ID N.º 272, SEC ID N.º 273, SEC ID N.º 274, SEC ID N.º 275, SEC ID N.º 276, SEC ID N.º 277, SEC ID N.º 278, SEC ID N.º 279, SEC ID N.º 280, SEC ID N.º 281, SEC ID N.º 282, SEC ID N.º 20 283, SEC ID N.º 284, SEC ID N.º 285, SEC ID N.º 286, SEC ID N.º 287, SEC ID N.º 288, SEC ID N.º 289, SEC ID N.º 290, SEC ID N.º 291, SEC ID N.º 292, SEC ID N.º 293, SEC ID N.º 294.

Según una realización, en la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención X₁ puede comprender uno cualquiera de los aminoácidos A, V, I, L, M o G; X₂ puede comprender los aminoácidos D, E; X₃ puede ser C; X₄ puede ser C o N; X₅ puede ser uno de S, T o N y X₆ puede ser uno de D o E. En consecuencia, la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 19, SEC ID N.º 20, SEC ID N.º 21, SEC ID N.º 22, SEC ID N.º 23, SEC ID N.º 67, SEC ID N.º 68, SEC ID N.º 69, SEC ID N.º 70, SEC ID N.º 71, SEC ID N.º 115, SEC ID N.º 116, SEC ID N.º 117, SEC ID N.º 118, SEC ID N.º 119, SEC ID N.º 139, SEC ID N.º 140, SEC ID N.º 141, SEC ID N.º 142, SEC ID N.º 143, SEC ID N.º 55, SEC ID N.º 56, SEC ID N.º 57, SEC ID N.º 58, SEC ID N.º 59, SEC ID N.º 103, SEC ID N.º 104, SEC ID N.º 105, SEC ID N.º 106, SEC ID N.º 107, SEC ID N.º 127, SEC ID N.º 128, SEC ID N.º 129, SEC ID N.º 130, SEC ID N.º 131, SEC ID N.º 13, SEC ID N.º 14, SEC ID N.º 15, SEC ID N.º 16, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 18, SEC ID N.º 85, SEC ID N.º 86, SEC ID N.º 87, SEC ID N.º 88, SEC ID N.º 89, SEC ID N.º 90, SEC ID N.º 109, SEC ID N.º 110, SEC ID N.º 111, SEC ID N.º 112, SEC ID N.º 113, SEC ID N.º 114, SEC ID N.º 133, SEC ID N.º 134, SEC ID N.º 135, SEC ID N.º 136, SEC ID N.º 137, SEC ID N.º 138, SEC ID N.º 25, SEC ID N.º 26, SEC ID N.º 27, SEC ID N.º 28, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 73, SEC ID N.º 74, SEC ID N.º 75, SEC ID N.º 76, SEC ID N.º 77, SEC ID N.º 78, SEC ID N.º 121, SEC ID N.º 122, SEC ID N.º 123, SEC ID N.º 124, SEC ID N.º 125, SEC ID N.º 126, SEC ID N.º 145, SEC ID N.º 146, SEC ID N.º 147, SEC ID N.º 148, SEC ID N.º 149, SEC ID N.º 150.

40

Según una realización preferida, la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 4 (X₁X₂ C TYFQAYG CX₅X₆) en la que tanto X₃ como X₄ son C de modo que se puede formar un enlace disulfuro entre los dos restos de cisteína X₃ y X₄, lo que

formará una estructura similar a un bucle, con los restos amino TYFQAYG formando la estructura similar a un bucle. En la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención X₁ puede ser un cualquiera de los aminoácidos A, V, I, L, M o G; X₂ puede ser D o E; X₃ y X₄ son ambos C; X₅ puede ser uno de S, T o N y X₆ puede ser uno de los aminoácidos D o E. En consecuencia, la secuencia donante de aminoácidos que contiene

- 5 acilglutamina de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos según una cualquiera de la SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 55, SEC ID N.º 56, SEC ID N.º 57, SEC ID N.º 58, SEC ID N.º 59, SEC ID N.º 103, SEC ID N.º 104, SEC ID N.º 105, SEC ID N.º 106, SEC ID N.º 107, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 32, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 35, SEC ID N.º 36, SEC ID N.º 79, SEC ID N.º 80, SEC ID N.º 81, SEC ID N.º 82, SEC ID N.º 83, SEC ID N.º 84, SEC ID N.º 127, SEC ID N.º 128, SEC ID N.º 10, 129, SEC ID N.º 130, SEC ID N.º 131, SEC ID N.º 13, SEC ID N.º 14, SEC ID N.º 15, SEC ID N.º 16, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 18, SEC ID N.º 61, SEC ID N.º 62, SEC ID N.º 63, SEC ID N.º 64, SEC ID N.º 65, SEC ID N.º 66, SEC ID N.º 109, SEC ID N.º 110, SEC ID N.º 111, SEC ID N.º 112, SEC ID N.º 113, SEC ID N.º 114, SEC ID N.º 37, SEC ID N.º 38, SEC ID N.º 39, SEC ID N.º 40, SEC ID N.º 41, SEC ID N.º 42, SEC ID N.º 85, SEC ID N.º 86, SEC ID N.º 87, SEC ID N.º 88, SEC ID N.º 89, SEC ID N.º 90, SEC ID N.º 133, SEC ID N.º 134, SEC ID N.º 135, SEC ID N.º 136, 15 SEC ID N.º 137, SEC ID N.º 138.

Los péptidos de la invención pueden sintetizarse según cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, según los métodos descritos en Atherton, E.; Sheppard, R.C. (1989). *Solid Phase peptide synthesis: a practical approach*. Oxford, England: IRL Press. ISBN 0-19-963067-4, o Stewart, J.M.; Young, J.D. (1984). *Solid phase peptide synthesis* (2.^a ed.), ISBN 0-935940-03-0). Los péptidos pueden sintetizarse también por ejemplo en una resina AmphiSpheres 40 RAM (Agilent, 0,27 mmol/g) mediante Fmoc-SPPS asistido con microondas utilizando un sintetizador de péptidos con microondas Liberty BlueTM a una escala de 0,1 mmol. La activación del correspondiente aminoácido carboxifuncional puede realizarse, por ejemplo, mediante Oxyma/**N,N'-diisopropilcarbodiimida** (DIC). La desprotección del grupo Fmoc aminoterminal puede realizarse, por ejemplo, usando piperidina al 20 % en DMF 25 en presencia de Oxyma. Durante los ciclos de síntesis, todos los aminoácidos pueden calentarse, por ejemplo, a 90 °C (cisteínas a 50 °C). Los péptidos pueden después, por ejemplo, escindirse de la resina mediante un cóctel de escisión estándar de TFA al 94 %, trietilsilano al 2 %, anisol al 2 %, H₂O al 2 %. Por ejemplo, tras la síntesis del péptido donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la SEC ID N.º 4, en condiciones de síntesis no oxidativa y escisión, como por ejemplo, en presencia de ditiotreitol (DTT) a una concentración, por ejemplo, de 30 aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM. Se puede lograr la formación de un puente disulfuro entre los restos X₃ y X₄ en condiciones de oxidación, por ejemplo, 1 mg ml⁻¹ en (NH₄)₂CO₃ ac. 100 mM pH 8,4, en la que la reacción de oxidación se puede monitorizar mediante RP-HPLC.

- 35 En una realización más preferida, en la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención, X₁ puede ser uno de los aminoácidos A, V, I, L, M o G; X₂ es E; X₃, X₄ son ambos C; X₅ es T y X₆ es E. En consecuencia, la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina puede comprender una cualquiera de las SEC ID N.º 85, SEC ID N.º 86, SEC ID N.º 87, SEC ID N.º 88, SEC ID N.º 89 o SEC ID N.º 90.

Según una realización más preferida, la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la 40 invención comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 90 (GECTYFQAYGCTE).

La secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención como se describe anteriormente puede estar, por ejemplo, unida covalentemente a una proteína de interés, como por ejemplo,

enzimas o anticuerpos. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención pueden añadirse a construcciones de ADNc que codifican cadenas ligeras o pesadas de anticuerpos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por ejemplo, se puede usar SOE-PCR según el principio descrito en PCR Methods Appl. 1993 May;2(4):301-4, o por ejemplo en Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 4(3/4):581-590 (1993).

En una realización, la proteína que comprende la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención como se describe anteriormente puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, dominio Fc, enzima, una estructura no inmunoglobulina. En consecuencia, la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención puede estar unida covalentemente a un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, dominio Fc, enzima o una estructura no inmunoglobulina.

Por ejemplo, la proteína según la invención comprende la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención puede ser un anticuerpo, en el que el término «anticuerpo» se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., mediante al menos un sitio de reconocimiento de antígeno localizado en la región variable de la

molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente invención, el término «anticuerpo» abarca no solo anticuerpos policlónicos o monoclónicos intactos, sino también, salvo que se especifique otra cosa, cualquier fragmento de unión a antígeno del mismo que compita con el anticuerpo intacto por la unión específica, proteínas de fusión que comprenden una porción de unión a antígeno, cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno, composiciones de anticuerpos con especificidad por varios epítopos, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos).

El término «anticuerpo monoclonal» como se usa para la proteína según la invención se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión e indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso según la

presente invención pueden obtenerse mediante el método de hibridoma (p. ej., murino o humano) descrito por primera vez por Köhler y cols., Nature, 256:495 (1975), o puede obtenerse mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Un «anticuerpo monoclonal» también puede aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson y cols., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks y cols., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

El término «anticuerpos monoclonales humanos» como se usa para la proteína según la invención se refiere a anticuerpos monoclonales que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas de la línea germinal. El término «humanizado» como se usa en el contexto de la presente invención preferiblemente se refiere a un anticuerpo monoclonal en el que la secuencia de aminoácidos es esencialmente idéntica a una variante humana, a pesar del origen no humano de algunas de sus secuencias de regiones determinantes de complementariedad (CDR) responsables de la capacidad del anticuerpo para unirse a su antígeno diana. El término «anticuerpo monoclonal químérico» como se usa en la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal en el que los fragmentos Fab murinos se han unido mediante ayuste al Fc humano.

En una realización, la proteína según la invención como se describe anteriormente es un fragmento de unión a antígeno. El término «fragmento de unión a antígeno» como se usa para la proteína de la invención se refiere, por ejemplo, a Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, anticuerpos de dominio, también denominados «nanocuerpos» (dAb o VHH,

p. ej., anticuerpos de tiburón y de camélidos, véase p. ej., mAbs [2015] 7:1, 15-25: Current Opinion in Structural Biology 2015, 32:1-8), fragmentos que incluyen regiones determinantes de complementariedad (CDR), anticuerpos de fragmento variable de cadena sencilla (scFv), maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv, y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es

5 suficiente para conferir una unión específica de antígeno al polipéptido. Un «anticuerpo biespecífico» como se usa según la invención es un anticuerpo que puede unirse a dos moléculas diana diferentes, «anticuerpo bivalente» según la invención es un anticuerpo que se puede unir a dos sitios diferentes de una única molécula diana. El término «scFv» como se usa en la presente invención se refiere a una molécula que comprende un dominio variable (o región; VH) de la cadena pesada de un anticuerpo y un dominio variable (o región; VL) de la cadena ligera de un

10 anticuerpo conectados mediante un enlazador y que carece de dominios constantes. Por ejemplo, la proteína de la invención puede ser un nanocuerpo que comprende la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención, por ejemplo, fusionada al extremo carboxiterminal del nanocuerpo. El nanocuerpo según la invención puede utilizarse entonces por ejemplo en una bioconjugación mediada por mTG2, en la que el sustrato que comprende el donante de grupos amino puede estar, por ejemplo, acoplado adicionalmente a un

15 enlazador-citotoxina como se describe anteriormente, o puede estar, por ejemplo, acoplado a un radioisótopo o a un colorante como se describe anteriormente. Los nanocuerpos de la invención pueden usarse, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer o para fines de estudio por imagen. Por ejemplo, los nanocuerpos de la invención acoplados a ^{68}Ga que se unen específicamente a EGFR o HER2 se pueden usar para estudios por PET para detectar o adquirir imágenes de tumores que expresan EGFR o HER2. El término «unión específica» o cualquiera de sus variantes

20 gramaticales se refiere a la capacidad del anticuerpo de la invención, fragmento de unión a antígeno (p. ej., Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv), anticuerpo monoclonal, anticuerpo de cadena sencilla (scFv) o nanocuerpo de unirse a su correspondiente diana (p. ej., EGFR o HER2) con una K_D de al menos aproximadamente 1×10^{-6} , por ejemplo, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, 1×10^{-13} M, 1×10^{-14} M, 1×10^{-15} M, preferiblemente entre 1×10^{-10} M y 1×10^{-15} M, más preferiblemente entre aproximadamente 1×10^{-12} M a

25 aproximadamente 1×10^{-15} M.

El término «inmunoglobulina» (Ig) como se usa en la presente invención puede utilizarse indistintamente con el término «anticuerpo». La unidad básica de anticuerpo de 4 cadenas es una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consta de 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA comprenden de 2 a 5 de las unidades básicas de 4 cadenas que pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas generalmente tiene aproximadamente 150 000 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro, dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados de forma regular. Cada cadena H tiene un dominio variable (V_H) en el extremo N-terminal, seguido por tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios CH para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene un dominio variable (VL) en el extremo N-terminal, seguido por un dominio constante en su otro extremo. El dominio VL está alineado con el VH y el dominio CL está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se considera que restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. El emparejamiento de un dominio VH y VL forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8.^a Edición, Daniel P. Sties, Abba I. Terr y Tristram

- G. Parsolw (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6. La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de los dos tipos claramente diferenciados, denominados kappa y lambda, en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas se pueden asignar a
- 5 diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases en función de diferencias relativamente menores en la secuencia y función de CH, por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 e Ig κ 1. La IgG constituye la clase principal, ya que normalmente existe como la segunda proteína más abundante que se encuentra en el plasma. En las proteínas de
- 10 fusión de inmunoglobulina, los dominios Fc de la subclase IgG1 se utilizan a menudo como el resto inmunoglobulina, puesto que la IgG1 tiene la semivida en suero más larga que cualquier otra proteína sérica. El resto Fc puede, por ejemplo, comprender también variantes de Fc como las que se describen en el documento WO 02/094852 (p. ej., secuencia de aminoácidos de Fc con las variantes Fc-488, Fc4, Fc5, Fc6, Fc7 y Fc8 como se describe en ese documento) para reducir la función efectora del resto Fc.
- 15 Por ejemplo, la proteína según la invención puede ser una proteína de fusión que comprende la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención y un dominio Fc para prolongar su semivida en suero, en la que la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención está fusionada al extremo carboxiterminal del resto Fc. El resto lisina (K) terminal puede eliminarse, por ejemplo, en los restos Fc, por ejemplo, en anticuerpos de tipo IgG, o en proteínas de fusión-Fc, mediante mutagénesis dirigida a sitio basada en
- 20 PCR para evitar entrecruzamiento intermolecular. La mutagénesis dirigida a sitio basada en PCR puede realizarse, por ejemplo, según el método descrito en Nucleic Acids Res. 25 agosto 1989;17(16):6545-51, Biotechniques. Octubre 1993;15(4):700-4, Nucl. Acids Res., 32:e115, 2004. Por ejemplo, la pareja de cebadores que se pueden usar para la mutagénesis dirigida a sitio puede, por ejemplo, seleccionarse también según la herramienta automatizada basada en la web disponible en: <http://bioinformatics.org/primerx>. Alternativamente, los
- 25 correspondientes ADNc que codifican la proteína según la invención carentes de un resto de lisina terminal pueden obtenerse mediante síntesis genética personalizada (véase, p. ej., Nature 432, 1050-1054 (23 diciembre 2004); Nucleic Acids Res. Abril 2007; 35(8): e61.; ACS Synth. Biol. 3, 97-106 (2014); Nat. Methods 6, 343-345 (2009); Nucleic Acids Res. 40, e55 (2012); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 20404-20409 (2008)).

En una realización, la proteína según la invención es una estructura no inmunoglobulina que comprende la

30 secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina. El término «estructura no inmunoglobulina» como se usa para la proteína según la invención se refiere a proteínas de afinidad que no se basan en moléculas de Ig. Las proteínas de estructura no inmunoglobulina incluyen, por ejemplo, las descritas en Nature Biotechnology 23, 1257-1268, 2005, Trends Biotechnol. Julio 2015;33(7):408-18. Por ejemplo, la proteína según la invención puede ser un dominio de unión a albúmina, proteína fitocistatina (Adhiron), adnectina, dominio Z de la proteína A de *S. aureus*, γ -

35 B-cristalina (afilina), estefina A, proteína de unión a ADN Sac7a, alfacuerpos lipocalinas (anticalinas) u homólogos de β -catenina (p. ej., proteína armadillo). Por ejemplo, la proteína según la invención como se describe en este documento puede comprender la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención, en la que la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina puede estar presente en el extremo aminoterminal o en el extremo carboxiterminal de la proteína según la invención. Un factor determinante en la

40 posición de la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención en el extremo amino o carboxiterminal de la proteína de la invención como se describe anteriormente es si interferirá o no con el uso

previsto de la proteína. Por ejemplo, en caso de que la proteína según la invención sea un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, se prefieren proteínas de fusión con la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina en el extremo carboxiterminal, en la que las que la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la SEC ID N.º 2 puede estar fusionada a la cadena ligera, o a la cadena pesada, o tanto a la

5 cadena pesada como a la ligera, proporcionando de este modo un anticuerpo monoclonal que comprende 2 (p. ej., en ambas cadenas ligeras [LC] o en ambas cadenas pesadas [HC]) o 4 secuencias donantes de aminoácidos que contienen acilglutamina según la invención.

En una realización, la presente invención proporciona un método para acoplar covalentemente un sustrato que comprende un donante de grupos amino según la invención como se describe anteriormente a un donante de

10 aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención que comprende una secuencia polipeptídica según la SEC ID N.º 2, en el que el método comprende los pasos de:

Poner en contacto un sustrato que comprende un donante de grupos amino según la invención y un donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención en presencia de transglutaminasa, preferiblemente mTG2, para obtener una proteína de la invención como se describe anteriormente. En consecuencia, en el método

15 de la invención, el sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención como se describe anteriormente y el donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención, por ejemplo, cualquiera de las SEC ID N.º 7 a 294 como se describe en este documento, se ponen en contacto en presencia de mTG2 para obtener la proteína de la invención como se describe anteriormente. El término «en contacto» como se usa en el método de la invención se refiere a cualquier situación en la que dos o más moléculas, como por ejemplo el sustrato

20 que comprende el donante de grupos amino y el donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención, se ponen en contacto físico íntimo entre sí, por ejemplo, formando parte de la misma mezcla de reacción o solución acuosa. Por ejemplo, la reacción mediada por mTG2 según el método de la invención puede comprender hacer reaccionar el donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención con un equivalente molar de 1-60, o un equivalente molar de 1-50 del sustrato que comprende el donante de grupos amino según la invención,

25 por ejemplo con un equivalente molar de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o por ejemplo, con un equivalente molar de aproximadamente 2 molar a aproximadamente 45 molar, de aproximadamente 5 molar a aproximadamente 40 molar, de aproximadamente 10 molar a aproximadamente 35 molar, de aproximadamente 12,5 molar a aproximadamente 30 molar, de aproximadamente 15 molar a aproximadamente 32,5 molar, de

30 aproximadamente 7,5 molar a aproximadamente 27,5 molar, de aproximadamente 17,5 molar a aproximadamente 25 molar, de aproximadamente 0,5 molar a aproximadamente 1 molar. La concentración del donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención puede ser de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 2,5 mg/ml a aproximadamente 45 mg/ml, de

35 aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml, de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 35 mg/ml, de aproximadamente 12,5 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 17,5 a aproximadamente 20 mg/ml, por ejemplo, 0,15 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,35 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,45 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,55 mg/ml; 0,6 mg/ml; 0,7 mg/ml; 0,8 mg/ml; 0,9 mg/ml; 2 mg/ml; 3 mg/ml; 4 mg/ml; 6 mg/ml; 7 mg/ml; 8 mg/ml; 9 mg/ml; 11 mg/ml; 12 mg/ml;

40 13 mg/ml; 14 mg/ml; 16 mg/ml; 19 mg/ml; 23 mg/ml; 27 mg/ml; 31 mg/ml; 33 mg/ml; 37,5 mg/ml; 41 mg/ml; 42 mg/ml; 43 mg/ml; 44 mg/ml; 46 mg/ml; 47 mg/ml; 48 mg/ml; 49 mg/ml.

En el método de la invención, mTG2 puede estar presente, por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente 0,01 equivalentes mol a aproximadamente 2 equivalentes mol con respecto al sustrato, por ejemplo, con respecto a la proteína que comprende la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina, de aproximadamente 0,05 equivalentes mol a aproximadamente 1,5 equivalentes mol, desde aproximadamente 0,1 equivalentes mol a 5 aproximadamente 1,125 equivalentes mol, de aproximadamente 0,125 equivalentes mol a aproximadamente 1,75 equivalentes mol, de aproximadamente 0,25 equivalentes mol, 0,3 equivalentes mol, 0,4 equivalentes mol, 0,5 equivalentes mol, 0,6 equivalentes mol, 0,7 equivalentes mol, 0,8 equivalentes mol a aproximadamente 1 equivalente mol, o de aproximadamente 1 equivalente mol a aproximadamente 2,5 equivalentes mol, preferiblemente mTG2 se usa en el método de la invención en una cantidad de aproximadamente 1 equivalente mol.

10 En el método de la invención, por ejemplo se puede permitir que la reacción se lleve a cabo a 25-37 °C durante aproximadamente 1-5 horas, o durante aproximadamente 2-4 horas, o durante aproximadamente 2,5 horas a aproximadamente 3,5 horas, o durante aproximadamente 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas. El método de la invención puede llevarse a cabo, por ejemplo, en cualquier tampón adecuado, como HEPES (ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinetanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) o PIPES (ácido piperazin-N,N'-bis(2-15 etanosulfónico) a un pH de aproximadamente 7,0.

Según una realización, el donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención que se puede usar en el método de la invención puede ser como se describe anteriormente, por ejemplo, el donante de aminoácidos que contiene acilglutamina puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, enzima o una estructura no inmunoglobulina como se describe anteriormente.

20 La transglutaminasa microbiana, como por ejemplo, mTG2 que puede usarse según las realizaciones de la presente invención, puede obtenerse de *Streptoverticillium mobaraense*, o cualquiera de sus subcepas, como por ejemplo, la 40847, según el método descrito en Biochem. J. (1994) 299:825-829. Por ejemplo, *Streptoverticillium mobaraense* puede cultivarse, por ejemplo, como se describe en Ando y cols. (1989) Agric. Biol. Chem. 53, 2613-2617: En matraces Erlenmeyer de 2 litros, se pueden crecer 0,1 ml de la suspensión de esporas en 500 ml de un medio que 25 contenga: polipeptona, 2,0 %; extracto de levadura, 0,2 %; K₂HPO₄, 0,2 %; MgSO₄·7H₂O, 0,1 %; almidón de patata, 2,0 %; glucosa, 0,5 %; pH 7,0. El cultivo se puede continuar a 30 °C y se puede airear y agitar a 90 rev./min durante 9-11 días hasta alcanzar el máximo de la actividad de la enzima. A continuación, se puede separar el líquido de cultivo del micelio mediante centrifugación a 10 000 g durante 10 min y la posterior filtración en papel de filtro plegado. El sobrenadante se puede utilizar directamente en cromatografía o conservarse a -20 °C para su uso 30 posterior. Para la producción a mayor escala, se puede transferir 1,0 ml de la suspensión celular a 3,5 litros de un medio que contenga almidón de patata al 2,5 % en lugar del 2,0 %, y glucosa al 1,0 % en lugar del 0,5 %. El cultivo se puede crecer con aireación (2 l/min) y agitación a 140-180 rev./min durante el primer día y, posteriormente, a 300-350 rev./min. El máximo de la actividad enzimática se logra normalmente a los 7 días. *Streptoverticillium mobaraense* puede obtenerse, por ejemplo, de la ATCC® (ATCC 29032), o por ejemplo de DSM, Braunschweig, 35 Alemania.

En una realización, el sustrato que comprende el donante de grupos amino de la invención que se usa en el método de la invención está acoplado o unido covalentemente a un colorante, fármaco, ribozima, nanocuerpo, enzima o enlazador como se describe anteriormente. Por ejemplo, el donante de aminoácidos que contiene acilglutamina puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno como se describe anteriormente que comprende en su 40 extremo carboxiterminal la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención según la SEC ID N.º 2 o, por ejemplo, según una cualquiera de las SEC ID N.º 7 a 294, como se describe en este documento.

Por ejemplo, el sustrato que comprende el donante de grupos amino puede ser como se define anteriormente, por ejemplo, puede ser un péptido que comprende al menos un resto de lisina, o el tripéptido GGG como se describe anteriormente que puede estar acoplado a un enlazador, colorante, fármaco, ribozima, nanocuerpo o enzima como se describe anteriormente.

- 5 Según una realización, el enlazador usado en el método de la invención puede estar además, por ejemplo, unido a un fármaco citotóxico (carga activa), colorante o radioisótopo como se define anteriormente. En el método de la invención, el donante de aminoácidos que contiene acilglutamina y el sustrato que comprende el donante de grupos amino pueden estar presentes, por ejemplo, en una mezcla de reacción en una relación equivalente molar de aproximadamente 1:40 (anticuerpo:sustrato que comprende donante de grupos amino) o cualquier equivalente molar
- 10 descrito anteriormente, con transglutaminasa microbiana 2 presente en una cantidad como se describe anteriormente, por ejemplo en una relación equivalente molar de 1:1 con respecto al anticuerpo que comprende la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina como se describe anteriormente. Según el método de la invención, se puede permitir, por ejemplo, que la reacción tenga lugar aproximadamente durante 1-5 horas a 25-37 °C, por ejemplo, 1 hora, 2 horas, 2,5 horas, 3 horas, 3,5 horas, 4 horas o 5 horas a 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C,
- 15 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C.

En una realización, la presente invención proporciona una proteína según la invención que se puede obtener mediante el método de la invención como se describe anteriormente. En consecuencia, la proteína que se puede obtener según la presente invención puede ser cualquier proteína como se describe en este documento, por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, una enzima o una estructura no inmunoglobulina como se describe en este documento, que comprende la secuencia de aminoácido según la SEC ID N.º 2. Por ejemplo, la proteína que se puede obtener mediante el método de la invención puede comprender un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende al menos una secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la SEC ID N.º 2 como se describe en este documento, preferiblemente 2, más preferiblemente 4 secuencias donantes de aminoácidos que contienen acilglutamina como se describe anteriormente que están unidas covalentemente a través de un enlace isopeptídico formado entre el donante de aminoácidos que contiene acilglutamina de la invención (p. ej., X₁X₂ X₃ TYFQAYG X₄X₅X₆), en el que el enlace isopeptídico está formado entre el resto de glutamina central (subrayado) y el grupo amino del sustrato que comprende el donante de grupos amino.

En una realización, la presente invención se refiere al uso de una secuencia polipeptídica según la SEC ID N.º 2 en el método de la invención como se describe anteriormente. En consecuencia, la presente invención se refiere al uso de una o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más secuencias polipeptídicas de la invención descritas en este documento en el método de la invención. La memoria descriptiva se refiere al uso de la SEC ID N.º 1, SEC ID N.º 2, SEC ID N.º 3, SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 5, SEC ID N.º 6, SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 12, SEC ID N.º 13, SEC ID N.º 14, SEC ID N.º 15, SEC ID N.º 16, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 18, SEC ID N.º 19, SEC ID N.º 20, SEC ID N.º 21, SEC ID N.º 22, SEC ID N.º 23, SEC ID N.º 24, SEC ID N.º 25, SEC ID N.º 26, SEC ID N.º 27, SEC ID N.º 28, SEC ID N.º 29, SEC ID N.º 30, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 32, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 35, SEC ID N.º 36, SEC ID N.º 37, SEC ID N.º 38, SEC ID N.º 39, SEC ID N.º 40, SEC ID N.º 41, SEC ID N.º 42, SEC ID N.º 43, SEC ID N.º 44, SEC ID N.º 45, SEC ID N.º 46, SEC ID N.º 47, SEC ID N.º 48, SEC ID N.º 49, SEC ID N.º 50, SEC ID N.º 51, SEC ID N.º 52, SEC ID N.º 53, SEC ID N.º 54, SEC ID N.º 55, SEC ID N.º 56, SEC ID N.º 57, SEC ID N.º 58, SEC ID N.º 59, SEC ID N.º 60, SEC ID N.º 61, SEC ID N.º 62, SEC ID N.º 63, SEC ID N.º 64, SEC ID N.º 65, SEC ID N.º 66, SEC ID N.º 67, SEC ID N.º 68, SEC ID N.º 69, SEC ID N.º 70, SEC ID N.º 71, SEC ID N.º 72, SEC ID N.º 73, SEC ID N.º 74, SEC ID N.º 75, SEC ID N.º 76, SEC ID N.º 77, SEC ID

N.º 78, SEC ID N.º 79, SEC ID N.º 80, SEC ID N.º 81, SEC ID N.º 82, SEC ID N.º 83, SEC ID N.º 84, SEC ID N.º 85, SEC ID N.º 86, SEC ID N.º 87, SEC ID N.º 88, SEC ID N.º 89, SEC ID N.º 90, SEC ID N.º 91, SEC ID N.º 92, SEC ID N.º 93, SEC ID N.º 94, SEC ID N.º 95, SEC ID N.º 96, SEC ID N.º 97, SEC ID N.º 98, SEC ID N.º 99, SEC ID N.º 100, SEC ID N.º 101, SEC ID N.º 102, SEC ID N.º 103, SEC ID N.º 104, SEC ID N.º 105, SEC ID N.º 106, SEC ID N.º 107, SEC ID N.º 108, SEC ID N.º 109, SEC ID N.º 110, SEC ID N.º 111, SEC ID N.º 112, SEC ID N.º 113, SEC ID N.º 114, SEC ID N.º 115, SEC ID N.º 116, SEC ID N.º 117, SEC ID N.º 118, SEC ID N.º 119, SEC ID N.º 120, SEC ID N.º 121, SEC ID N.º 122, SEC ID N.º 123, SEC ID N.º 124, SEC ID N.º 125, SEC ID N.º 126, SEC ID N.º 127, SEC ID N.º 128, SEC ID N.º 129, SEC ID N.º 130, SEC ID N.º 131, SEC ID N.º 132, SEC ID N.º 133, SEC ID N.º 134, SEC ID N.º 135, SEC ID N.º 136, SEC ID N.º 137, SEC ID N.º 138, SEC ID N.º 139, SEC ID N.º 140, SEC ID N.º 141, SEC ID N.º 142, SEC ID N.º 143, SEC ID N.º 144, SEC ID N.º 145, SEC ID N.º 146, SEC ID N.º 147, SEC ID N.º 148, SEC ID N.º 149, SEC ID N.º 150, SEC ID N.º 151, SEC ID N.º 152, SEC ID N.º 153, SEC ID N.º 154, SEC ID N.º 155, SEC ID N.º 156, SEC ID N.º 157, SEC ID N.º 158, SEC ID N.º 159, SEC ID N.º 160, SEC ID N.º 161, SEC ID N.º 162, SEC ID N.º 163, SEC ID N.º 164, SEC ID N.º 165, SEC ID N.º 166, SEC ID N.º 167, SEC ID N.º 168, SEC ID N.º 169, SEC ID N.º 170, SEC ID N.º 171, SEC ID N.º 172, SEC ID N.º 173, SEC ID N.º 174, SEC ID N.º 175, SEC ID N.º 176, SEC ID N.º 177, SEC ID N.º 178, SEC ID N.º 179, SEC ID N.º 180, SEC ID N.º 181, SEC ID N.º 182, SEC ID N.º 183, SEC ID N.º 184, SEC ID N.º 185, SEC ID N.º 186, SEC ID N.º 187, SEC ID N.º 188, SEC ID N.º 189, SEC ID N.º 190, SEC ID N.º 191, SEC ID N.º 192, SEC ID N.º 193, SEC ID N.º 194, SEC ID N.º 195, SEC ID N.º 196, SEC ID N.º 197, SEC ID N.º 198, SEC ID N.º 199, SEC ID N.º 200, SEC ID N.º 201, SEC ID N.º 202, SEC ID N.º 203, SEC ID N.º 204, SEC ID N.º 205, SEC ID N.º 206, SEC ID N.º 207, SEC ID N.º 208, SEC ID N.º 209, SEC ID N.º 210, SEC ID N.º 211, SEC ID N.º 212, SEC ID N.º 213, SEC ID N.º 214, SEC ID N.º 215, SEC ID N.º 216, SEC ID N.º 217, SEC ID N.º 218, SEC ID N.º 219, SEC ID N.º 220, SEC ID N.º 221, SEC ID N.º 222, SEC ID N.º 223, SEC ID N.º 224, SEC ID N.º 225, SEC ID N.º 226, SEC ID N.º 227, SEC ID N.º 228, SEC ID N.º 229, SEC ID N.º 230, SEC ID N.º 231, SEC ID N.º 232, SEC ID N.º 233, SEC ID N.º 234, SEC ID N.º 235, SEC ID N.º 236, SEC ID N.º 237, SEC ID N.º 238, SEC ID N.º 239, SEC ID N.º 240, SEC ID N.º 241, SEC ID N.º 242, SEC ID N.º 243, SEC ID N.º 244, SEC ID N.º 245, SEC ID N.º 246, SEC ID N.º 247, SEC ID N.º 248, SEC ID N.º 249, SEC ID N.º 250, SEC ID N.º 251, SEC ID N.º 252, SEC ID N.º 253, SEC ID N.º 254, SEC ID N.º 255, SEC ID N.º 256, SEC ID N.º 257, SEC ID N.º 258, SEC ID N.º 259, SEC ID N.º 260, SEC ID N.º 261, SEC ID N.º 262, SEC ID N.º 263, SEC ID N.º 264, SEC ID N.º 265, SEC ID N.º 266, SEC ID N.º 267, SEC ID N.º 268, SEC ID N.º 269, SEC ID N.º 270, SEC ID N.º 271, SEC ID N.º 272, SEC ID N.º 273, SEC ID N.º 274, SEC ID N.º 275, SEC ID N.º 276, SEC ID N.º 277, SEC ID N.º 278, SEC ID N.º 279, SEC ID N.º 280, SEC ID N.º 281, SEC ID N.º 282, SEC ID N.º 283, SEC ID N.º 284, SEC ID N.º 285, SEC ID N.º 286, SEC ID N.º 287, SEC ID N.º 288, SEC ID N.º 289, SEC ID N.º 290, SEC ID N.º 291, SEC ID N.º 292, SEC ID N.º 293 o SEC ID N.º 294.

El polipéptido según la SEC ID N.º 2 puede estar fusionado en su extremo carboxiterminal a la HC o LC de un anticuerpo como se describe anteriormente. Por ejemplo, se prefieren las secuencias en las que tanto X₃ como X₄ son C como se describe anteriormente, en consecuencia, el uso de las secuencias SEC ID N.º 7, SEC ID N.º 8, SEC ID N.º 9, SEC ID N.º 10, SEC ID N.º 11, SEC ID N.º 55, SEC ID N.º 56, SEC ID N.º 57, SEC ID N.º 58, SEC ID N.º 59, SEC ID N.º 103, SEC ID N.º 104, SEC ID N.º 105, SEC ID N.º 106, SEC ID N.º 107, SEC ID N.º 31, SEC ID N.º 32, SEC ID N.º 33, SEC ID N.º 34, SEC ID N.º 35, SEC ID N.º 36, SEC ID N.º 79, SEC ID N.º 80, SEC ID N.º 81, SEC ID N.º 82, SEC ID N.º 83, SEC ID N.º 84, SEC ID N.º 127, SEC ID N.º 128, SEC ID N.º 129, SEC ID N.º 130, SEC ID N.º 131, SEC ID N.º 13, SEC ID N.º 14, SEC ID N.º 15, SEC ID N.º 16, SEC ID N.º 17, SEC ID N.º 18, SEC ID N.º 61, SEC ID N.º 62, SEC ID N.º 63, SEC ID N.º 64, SEC ID N.º 65, SEC ID N.º 66, SEC ID N.º 109, SEC ID N.º 110, SEC ID N.º 111, SEC ID N.º 112, SEC ID N.º 113, SEC ID N.º 114, SEC ID N.º 37, SEC ID N.º 38, SEC ID N.º 35

39, SEC ID N.º 40, SEC ID N.º 41, SEC ID N.º 42, SEC ID N.º 85, SEC ID N.º 86, SEC ID N.º 87, SEC ID N.º 88, SEC ID N.º 89, SEC ID N.º 90, SEC ID N.º 133, SEC ID N.º 134, SEC ID N.º 135, SEC ID N.º 136, SEC ID N.º 137, o SEC ID N.º 138, más preferido es el uso de cualquiera de las SEC ID N.º 85, SEC ID N.º 86, SEC ID N.º 87, SEC ID N.º 88, SEC ID N.º 89 o SEC ID N.º 90.

5

En una realización, la presente invención también proporciona polinucleótidos que codifican un polipéptido según la SEC ID N.º 2. En consecuencia, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican el polipéptido de la invención según la SEC ID N.º 2 de la siguiente estructura:

10 5'-NNN₁ NNN₂ NNN₃ ACN TAY TTY CAR GCN TAY GGN NNN₄ NNN₅ NNN₆-3'
(SEC ID N.º 301),

donde N indica cualquier nucleótido (A, C, T, G), Y indica una base pirimidina (C o T), R indica una base purina (A o G). La nomenclatura sigue las normas del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica (NC-IUB), véase por ejemplo, J. Biol. Chem, 1986, 261, 13-17. NNN₁-NNN₆ indica los codones 1-6, donde el codón NNN₁ codifica el aminoácido X₁ de la SEC ID N.º 2, NNN₂ el aminoácido X₂ de la SEC ID N.º 2, NNN₃ el aminoácido X₃ de la SEC ID N.º 2, NNN₄ el aminoácido X₄ de la SEC ID N.º 2, NNN₅ el aminoácido X₅ de la SEC ID N.º 2 y NNN₆ el aminoácido X₆ de la SEC ID N.º 2. Por ejemplo, dependiendo del uso previsto de los polinucleótidos, el uso de codones debe optimizarse para el huésped específico, por ejemplo, en caso de que los polinucleótidos se usen para la expresión del péptido de la invención o de la proteína de la invención como se describe anteriormente en un huésped mamífero, eucariota o procariota, se debe considerar el uso diferente de codones según el correspondiente huésped. Por ejemplo, si el polinucleótido de la invención se usa para la expresión en una línea celular de roedor o humana, como las células CHO o HEK 293, para la fabricación de un agente terapéutico, el correspondiente uso de codones debe usarse para incrementar, por ejemplo, la producción de proteína (Trends in Molecular Medicine, noviembre 2014, Vol. 20, N.º 11). Los codones NNN₁-NNN₆ según la invención pueden no codificar, sin embargo, un codón de parada, por ejemplo, TAG (ámbar), TAA (ocre) o TGA (ópalo).

En consecuencia, NNN₁ puede ser uno cualquiera de los codones GCT, GCC, GCA, GCG, GTT, GTC, GTA, GTG, ATT, ATC, ATA CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG, ATG, GGT, GGC, GGA, GGG; NNN₂ puede ser uno cualquiera de los codones GAT, GAC, GAA, GAG; NNN₃, NNN₄ pueden ser uno cualquiera de los codones TGT, TGC, AAT, AAC; NNN₅ puede ser uno cualquiera de los codones TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC, ACT, ACC, ACA, ACG, AAT, AAC, CAA, CAG; NNN₆ puede ser uno cualquiera de los codones GAT, GAC, GAA, GAG.

En una realización, la presente invención también proporciona un vector que comprende los polinucleótidos de la invención como se describe anteriormente. El vector según la invención puede ser, por ejemplo, un vector de expresión. El término «vector de expresión» como se usa para el vector según la invención se refiere a un vector de ácido nucleico que comprende una región que controla la expresión génica, como un promotor o componente de promotor, operativamente unido a una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un polipéptido, por ejemplo, al menos la secuencia polipeptídica de la invención según cualquiera de las SEC ID N.º 2 a SEC ID N.º 294. Los vectores de expresión pueden incluir, por ejemplo, vectores de expresión basados en pCMV, o vectores de expresión basados en pD912 y sus variantes, vectores de expresión Gateway®, vectores de expresión basados en pcDNA, o vectores de expresión pJΩ (véase p. ej., Nucleic Acids Research, Vol. 18, N.º 4), o vectores que pueden

usarse para producción retroviral o lentiviral (véase p. ej., *Front Biosci.* 1 jun 1999;4:D481-96). En el vector según la invención, los polinucleótidos pueden comprender, por ejemplo, 5' o 3' en un sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés), que permitirá generar proteínas de fusión en marco cuando el correspondiente ADNc que codifica, por ejemplo, la cadena ligera o pesada de un anticuerpo, está clonado en el MCS. Dependiendo de la

- 5 localización del MCS, el polinucleótido de la invención se expresará como proteína de fusión aminoterminal o carboxiterminal.

En una realización, la presente invención también proporciona una célula huésped que comprende la secuencia polinucleotídica de la invención como se describe anteriormente, por ejemplo, según la SEC ID N.º 2, o por ejemplo,

- 10 cualquiera de las SEC ID N.º 7 a 294, o que comprende un vector según la invención como se describe anteriormente. Por ejemplo, una célula huésped según la invención que comprende el polinucleótido de la invención o un vector según la invención como se describe anteriormente se refiere a cualquier tipo de célula que puede contener el vector según la invención. La célula huésped puede ser una célula eucariota, por ejemplo, de planta, animal, hongo o alga (p. ej., *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlamydomonas reinhardtii*) o puede ser una célula 15 procariota, por ejemplo, de bacteria o protozoo. La célula huésped puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un ser humano. La célula huésped puede ser una célula adherente o una célula en suspensión, es decir, una célula que crece en suspensión. Una célula huésped según la invención puede incluir, por ejemplo, HEK293, HEK293T, HEK293E, HEK293F, NS0, per.C6, MCF-7, HeLa, 20 Cos-1, Cos-7, PC-12, 3T3, Vero, vero-76, PC3, U87, SAOS-2, LNCAP, DU145, A431, A549, B35, H1299, HUVEC, Jurkat, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-435, Caco-2, CHO, CHO-K1, CHO-B11, CHO-DG44, BHK, AGE1.HN, 25 Namalwa, WI-38, MRC-5, HepG2, L-929, RAB-9, SIRC, RK13, 11B11, 1D3, 2.4G2, A-10, B-35, C-6, F4/80, IEC-18, L2, MH1C1, NRK, NRK-49F, NRK-52E, RMC, CV-1, BT, MDBK, CPAE, MDCK.1, MDCK.2 y D-17, o por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Kluyveromyceslactis*, *Yarrowia lipolytica* y *Pichia pastoris*, o por ejemplo, células Sf9, Sf21, S2, Hi5 o BTI-TN-5B1-4, o por ejemplo *E. coli*. DH5α.

En una realización, la presente invención proporciona también un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, anticuerpo bivalente o anticuerpo VHH que comprende al menos una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2. Los anticuerpos, los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, los anticuerpos bivalentes o los

- 30 anticuerpos VHH según la invención son como se describe anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo según la invención puede comprender al menos una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2 (p. ej., el donante de aminoácidos que contiene acilglutamina según la invención), por ejemplo, como fusión carboxiterminal a una cadena ligera o pesada. El anticuerpo según la invención preferiblemente comprende 2 o 4 secuencias de aminoácidos de la invención según la SEC ID N.º 2, por ejemplo, el anticuerpo de la invención puede comprender dos cadenas ligeras, 35 o dos cadenas pesadas que comprenden en su extremo carboxilo terminal la secuencia de aminoácidos de la invención según la SEC ID N.º 2. Preferiblemente, tanto la cadena pesada como la ligera comprenden como fusiones carboxiterminales la secuencia de aminoácidos de la invención según la SEC ID N.º 2. Los anticuerpos de la invención pueden modificarse también, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida a sitio basada en PCR como se describe anteriormente para eliminar el resto de lisina terminal en el dominio Fc.

40

Según una realización, el anticuerpo según la invención como se describe anteriormente es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado como se describe anteriormente, preferiblemente, un anticuerpo de tipo IgG1,

IgG2, IgG3, IgG4 o IgM. El anticuerpo de la invención comprende al menos un enlazador acoplado covalentemente a él según el método de la invención descrito anteriormente. Por ejemplo, el anticuerpo de la invención puede comprender uno, dos, tres o cuatro enlazadores (p. ej., escindibles o no escindibles como se describe anteriormente) que se han acoplado covalentemente al anticuerpo según el método de la invención descrito en este documento.

- 5 Según una realización de la invención, el enlazador está acoplado además a un colorante, radioisótopo o citotoxina como se describe anteriormente.

En una realización, el anticuerpo de la invención como se describe anteriormente se une específicamente a antígenos de la superficie de células cancerosas. Los antígenos de la superficie de células cancerosas según la 10 invención incluyen, pero sin limitaciones, EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), HER2, HER4, AFP, integrina $\alpha_v\beta_3$, MUC16, CD4, CD20, CD22, CD30, CD33, CD52, CD56, CD66e, CD140b, CD227, EpCam, GD3, PSMA o VEGF. Los antígenos de la superficie de células cancerosas según la invención también incluyen células madre cancerosas, como por ejemplo, CD123, CLL-1, combinaciones de receptores SLAM (receptores de la familia 15 de moléculas de activación linfocítica de señalización; véase Yilmaz y cols., «SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity», Hematopoiesis 107: 924-930 [2006]), como CD150, CD244 y CD48 y los marcadores descritos en la patente de EE. UU. N.º 6.004.528.

En una realización preferida, el anticuerpo según la invención es cetuximab (c225) o, por ejemplo, un biosimilar del 20 mismo que se une al EGFR. El término «biosimilar» como se usa para el cetuximab de la invención se usa de una forma que concuerda con la definición funcional promulgada por la FDA estadounidense que define un producto biosimilar como aquel que es «altamente similar» a un producto de referencia (a pesar de diferencias menores en los componentes clínicamente inactivos). En la práctica pueden no existir diferencias clínicamente significativas entre el 25 producto de referencia y el producto biosimilar en términos de seguridad, pureza y potencia (Public Health Service [PHS] Act §262).

Por ejemplo, cetuximab (o, p. ej., su biosimilar) según la invención comprende al menos una, preferiblemente al 30 menos dos, más preferiblemente cuatro secuencias donantes de aminoácidos que contienen acilglutamina según la invención. Por ejemplo, cetuximab según la invención comprende dos, o preferiblemente cuatro enlazadores como se define anteriormente acoplados adicionalmente a una citotoxina como anteriormente.

Según una realización, cetuximab (o, p. ej., su biosimilar) según la invención pueden usarse en el tratamiento del 35 cáncer. El término «cáncer» como se usa en la presente invención se refiere a un trastorno celular caracterizado por la proliferación celular descontrolada o mal regulada, disminución de la diferenciación celular, capacidad inapropiada para invadir el tejido circundante y/o capacidad para establecer un nuevo crecimiento en sitios ectópicos. El término «cáncer» además comprende cánceres primarios y metastásicos. El anticuerpo cetuximab de la invención puede 40 usarse, por ejemplo, para tratar uno de entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer pancreático, preferiblemente cáncer colorrectal, metastásico (CCRm), metástasis hepáticas irresecables, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC). Cetuximab (c225, o su biosimilar) se puede usar, por ejemplo, en pacientes que se beneficien en particular de dicho tratamiento, por ejemplo, pacientes con cáncer colorrectal metastásico con RAS de tipo natural y expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico

(EGFR). Cetuximab según la invención (o su biosimilar) se puede usar también en combinación con quimioterapia con irinotecán o, por ejemplo, en el tratamiento de primera línea en combinación con FOLFOX o, por ejemplo, como monoterapia en pacientes en los que el tratamiento con oxaliplatino y con irinotecán no ha sido eficaz y en pacientes que no toleran irinotecán.

5

En una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo de la invención como se describe anteriormente, que comprende al menos un principio farmacéuticamente activo adicional. Por ejemplo, la composición según la invención puede comprender cetuximab (o p. ej., su biosimilar) en forma acuosa o liofilizada y al menos un fármaco quimioterapéutico, en el que el fármaco se selecciona a partir del grupo que comprende capecitabina, 5-fluoro-2'-deoxiuridina, irinotecán, 6-mercaptopurina (6-MP), cladribina, clofarabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, bleomicina, paclitaxel, clorambucilo, mitoxantrona, camptotecina, topotecán, tenipósido, colcemida, colchicina, pemetrexed, pentostatina, tioguanina; leucovorina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, o una combinación de 5-FU, leucovorina, una combinación de 5-fluorouracilo/ácido folínico (5-FU/FA), una combinación de 5-fluorouracilo/ácido folínico (5-FU/FA) y oxaliplatino (FLOX), una combinación de 5-FU, leucovorina, oxaliplatino (FOLFOX), o una combinación de 5-FU, leucovorina e irinotecán (FOLFIRI), o una combinación de leucovorina, 5-FU, oxaliplatino e irinotecán (FOLFOXIRI), o una combinación de capecitabina y oxaliplatino (CapeOx).

Según una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención como se describe anteriormente o la composición según la invención y al menos un principio adicional. En consecuencia, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo de la invención y que comprenden excipientes y/o estabilizadores y/o tensioactivos y/o conservantes. El término «excipientes» como se usa en este documento significa un componente de un producto farmacéutico que no es un principio activo, como por ejemplo, diluyentes. Los excipientes que son útiles en la preparación de la composición farmacéutica de la invención son generalmente seguros y no tóxicos. Los tensioactivos que se pueden usar con la composición farmacéutica de la invención incluyen, por ejemplo, tensioactivos aniónicos, como por ejemplo una mezcla de alquil sulfatos de sodio, tensioactivos catiónicos, como por ejemplo amonio cuaternario y tensioactivos catiónicos piridinio, o tensioactivos no iónicos, como por ejemplo ésteres de sorbitán, polisorbatos, por ejemplo polisorbato 20 (monolaurato de polioxietilen-(20)-sorbitán), polisorbato 21 (monolaurato de polioxietilen-(4)-sorbitán), polisorbato 40 (monopalmitato de polioxietilen-(20)-sorbitán), polisorbato 60 (monoestearato de polioxietilen-(20)-sorbitán), polisorbato 61 (monoestearato de polioxietilen-(4)-sorbitán), polisorbato 65 (triestearato de polioxietilen-(20)-sorbitán), polisorbato 80 (monooleato de polioxietilen-(20)-sorbitán), polisorbato 81 (monooleato de polioxietilen-(5)-sorbitán), polisorbato 85 (trioleato de polioxietilen-(20)-sorbitán), polisorbato 120 (monoisoestearato de polioxietilen-(20)-sorbitán), o poloxámeros, por ejemplo poloxámero 105, poloxámero 108, poloxámero 122, poloxámero 124, benzoato de poloxámero 105. Los conservantes que pueden comprender la composición farmacéutica según la invención puede ser cloruro de benzalconio en una concentración del 0,004 % al 0,01 %.

En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que lo necesita afectado por el cáncer, en el que el tratamiento comprende la administración a dicho sujeto (p. ej., un paciente, en el que el paciente es preferiblemente un humano) de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica como se describe en este documento. En consecuencia, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que lo necesita afectado por el cáncer, por ejemplo, como se describe anteriormente, con una cantidad

terapéuticamente eficaz del anticuerpo c225 (cetuximab) de la invención, por ejemplo, cetuximab según la invención puede administrarse en una concentración de aproximadamente 125 mg/m² a aproximadamente 500 mg/m² de superficie corporal, preferiblemente de aproximadamente 250 mg/m² a aproximadamente 400 mg/m² de superficie corporal, en el que la dosis de cetuximab puede calcularse, por ejemplo, según el método de Dubois, en el que la superficie corporal de un sujeto (m²) se calcula usando el peso corporal del sujeto: m² = (peso en kg^{0,425} × estatura en cm^{0,725}) × 0,007184.

EJEMPLOS

10 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente la invención. No pretenden limitar el objeto o alcance de la invención a los mismos.

Ejemplo 1

15 Síntesis y purificación de péptidos en fase sólida

Los péptidos se sintetizaron en una resina AmphiSpheres 40 RAM (Agilent, 0,27 mmol/g) mediante Fmoc-SPPS asistido con microondas utilizando un sintetizador de péptidos con microondas Liberty Blue™ a una escala de 0,1 mmol. La activación del correspondiente aminoácido carboxifuncional se realizó mediante Oxyma/N,N'-20 diisopropilcarbodiimida (DIC). La desprotección del grupo Fmoc aminoterminal se realizó usando piperidina al 20 % en DMF en presencia de Oxyma. Durante los ciclos de síntesis, todos los aminoácidos se calentaron a 90 °C (cisteínas a 50 °C). Los péptidos se escindieron de la resina mediante un cóctel de escisión estándar de TFA al 94 %, trietilsilano al 2 %, anisol al 2 %, H₂O al 2 %. Los péptidos que contenían cisteínas se escindieron en presencia de ditiotreitol (DTT) para inhibir la oxidación no deseada de las cisteínas. Despues de 2 h de escisión, los 25 péptidos se precipitaron en dietiléter frío y se lavaron dos veces con dietiléter. El péptido sin procesar con puentes disulfuro se oxidó a 1 mg ml⁻¹ en (NH₄)₂CO₃ ac. 100 mM pH 8,4 y se monitorizó la oxidación mediante RP-HPLC. A continuación, se aislaron los péptidos mediante RP-HPLC preparativa.

RP-HPLC.

30 Los péptidos se analizaron mediante cromatografía en un sistema de RP-HPLC analítica de Varian (920-LC) usando una columna de CL Phenomenex Hypersil 5u BDS C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm, 130 Å). Los péptidos se aislaron mediante RP-HPLC semipreparativa (Varian) usando una columna de CL Phenomenex Luna 5u C18 (250 × 12,2 mm, 5 µm, 100 Å). Eluyente A (agua) y eluyente B (MeCN ac. al 90 %) cada uno con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %.

Análisis mediante ESI-EM.

40 Los espectros de masas con ionización por electropulverización (ESI) se recogieron en un aparato LCMS-2020 de Shimadzu equipado con una columna de CL Phenomenex Jupiter 5u C4 (50 × 1 mm, 5 µm, 300 Å) usando un sistema de eluyentes de ácido fórmico ac. al 0,1 % (eluyente A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 % (eluyente B).

Ejemplo 2Ensayos de biotinilación de péptidos.

- 5 Los péptidos se disolvieron a 50 mg/ml en DMSO y se diluyeron a 1,25 mg/ml en HEPES 100 mM pH 7,0 para la conjugación enzimática. Se añadió monobiotinil cadaverina en un exceso molar de 5 veces sobre el péptido y las reacciones enzimáticas se iniciaron mediante la adición de transglutaminasa microbiana a una relación enzima/sustrato de 1/50 (p/p). Para los ensayos de biotinilación de péptidos que implicaban el péptido 2 (SEC ID N.º 90) y el péptido de referencia GGGSLLLQG (SEC ID N.º 295), la cantidad de transglutaminasa microbiana se redujo a 10 una relación enzima/sustrato de 1/385 y 1/182 (p/p), respectivamente. Las reacciones se incubaron a 37 °C. Las alícuotas de la mezcla de reacción se recogieron después de 0, 15, 30, 60, 120 y 180 min y las reacciones se detienen mediante la eliminación de la transglutaminasa usando diálisis con centrifugación (Microcon-10, 10 000 NMWL, Merck Millipore). Las alícuotas se analizaron mediante RP-HPLC usando un gradiente del 10 al 80 % de eluyente B (MeCN ac. al 90 %) durante 20 min a 1 ml/min (véase la figura 4). Las fracciones recogidas de los 15 análisis mediante RP-HPLC se analizaron adicionalmente mediante ESI-EM.

Ejemplo 3Conjugación enzimática del anticuerpo usando la transglutaminasa.

- 20 **Expresión y purificación del anticuerpo.** Los plásmidos que codificaban el cetuximab (Erbitux®) sin modificar (wt) fueron proporcionados amablemente por Merck Serono (Darmstadt). Los mutantes de cetuximab que contenían las etiquetas TG en el extremo C-terminal de la cadena pesada se prepararon mediante técnicas convencionales de SOE-PCR como se describe anteriormente. La lisina C-terminal se omitió en ambas construcciones para evitar la 25 reactividad cruzada del grupo amino ε con las glutaminas accesibles a la transglutaminasa. Los anticuerpos se expresaron transitoriamente a partir de células HEK293F usando el sistema de expresión Expi293 (Life Technologies). Se aplicaron los sobrenadantes condicionados a columnas de centrifugación con medio PROSEP-A (Montage, Merck Millipore) y se lavaron con glicina/NaOH 1,5 M, NaCl 3 M, pH 9,0. Las proteínas se eluyeron con glicina/HCl 0,2 M pH 2,5 y se neutralizaron con Tris/HCl 1 M pH 9,0. Las proteínas eluidas se dializaron en DPBS 1x 30 (Life Technologies) y se conservaron a 4 °C.

- 35 **Generación de cetuximab con etiqueta mediante PCR (sin lisina terminal de la cadena pesada).** La PCR se usó para generar las construcciones de c225 (cetuximab) que carecían del resto de lisina carboxiterminal de la cadena pesada. Los plásmidos que codificaban c225 que incluía un resto de lisina terminal y la secuencia de aminoácidos carboxiterminal según la SEC ID N.º 246 se amplificaron usando cebadores con las secuencias según las SEC ID N.º 296, SEC ID N.º 299 (ambas a 1 pmol) durante 10 ciclos (condiciones de PCR: 3 min a 98 °C [desnaturalización inicial] 10 s a 98 °C, 30 s a 55 °C, 15 s a 72 °C), seguido de 20 ciclos usando cebadores con las secuencias según las SEC ID N.º 296, SEC ID N.º 300 (cebadores a 10 pmol) con las siguientes condiciones de los ciclos: 10 s a 98 °C, 30 s a 55 °C, 15 s a 72 °C, extensión final 5 min a 72 °C.

- 40 El producto resultante de la amplificación se purificó en gel y posteriormente se sometió a una digestión con enzimas de restricción usando EcoRV/BamHI (3 h a 37 °C). El fragmento de restricción se purificó a continuación usando un kit de purificación de PCR. Posteriormente, el fragmento se clonó en un vector pTT5_C225_HC (que codificaba la

cadena pesada de c225) digerido con EcoRV/BamHI.

Conjugación del anticuerpo usando la transglutaminasa. Los anticuerpos se ajustaron a 0,5 mg/ml y se incubaron con 40 equivalentes mol por sitio de conjugación de monobiotinil cadaverina (MBC) y 1 equivalente mol de 5 transglutaminasa microbiana (mTGasa) en tampón HEPES 100 mM pH 7,0 durante 3 h a 25 °C. Por cuestiones analíticas, las reacciones se analizaron en SDS-PAGE al 15 % y las cadenas pesadas biotiniladas se visualizaron mediante inmunotransferencia semiseca con un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina y NBT/BCIP. Para la producción preparativa de los conjugados de anticuerpo, se eliminó el exceso de mTGasa y de sustrato mediante 10 cromatografía de exclusión molecular con tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0 (Superdex S200 10/300 GL, GE Healthcare, 0,5 ml/min).

Ánalisis de los anticuerpos conjugados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Antes del análisis mediante EM, los anticuerpos (6 µg) se redujeron en colorante de carga-SDS que contenía 2-mercaptopetanol y las cadenas pesadas y ligeras se separaron en condiciones desnaturizantes mediante SDS-PAGE al 15 %. Las 15 proteínas se visualizaron mediante tinción con Coomassie-MeOH. Se escindieron las bandas de proteínas correspondientes a las cadenas pesadas, se cortaron en trozos pequeños y se lavaron dos veces con agua MQ durante 15 min para eliminar el ACOH y el MeOH de la tinción. A continuación, se lavaron los trozos de gel dos veces con MeCN:bicarbonato de amonio 50 mM pH 8,0 a una relación 2:3 durante 30 min para eliminar la tinción. Los trozos de gel se deshidrataron con MeCN y se secaron a 50 °C. Se añadió ditiotreitol (DTT) 20 mM en bicarbonato 20 de amonio 50 mM y la muestra se incubó a 60 °C durante 45 min para reducir los enlaces disulfuro. Una vez enfriada la muestra hasta temperatura ambiente, la solución de DTT se eliminó y las cisteínas reducidas se alquilaron mediante la adición de yodoacetamida (IAA) 55 mM en bicarbonato de amonio 50 mM durante 45 min en oscuridad. El exceso de mezcla de alquilación se eliminó y los trozos de gel se lavaron dos veces con bicarbonato de amonio 50 mM pH 8,0. A continuación, los trozos de gel se deshidrataron con MeCN y se rehidrataron en bicarbonato de 25 amonio 50 mM dos veces, antes se deshidrataron y rehidrataron en bicarbonato de amonio 50 mM que contenía 20 ng/µl de tripsina (NEB, Trypsin-ultra, calidad para espectrometría de masas) para obtener una relación final enzima/sustrato de 1:20. La digestión con tripsina se realizó durante toda la noche a 37 °C. Los péptidos se extrajeron dos veces mediante la adición de MeCN al 50 %, ácido fórmico al 1 % durante 30 min en agitación. Los sobrenadantes combinados que contenían los péptidos se liofilizaron y analizaron mediante EM MALDI-TOF. El 30 procedimiento de digestión en gel se adaptó de la literatura (M. Wilm, A. Shevchenko, T. Houthaeve, S. Breit, L. Schweigerer, T. Fotsis, M. Mann, Nature 1996, 379, 466-469.).

Determinación de la eficiencia de la conjugación de anticuerpos mediante la medición de la fluorescencia. La eficiencia de la conjugación de los anticuerpos se determinó mediante el marcaje de los anticuerpos con N-35 (tetrametilrodaminiil) cadaverina (TAMRA-cadaverina) y la medición de la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 547 nm y una longitud de onda de emisión de 573 nm. Para este fin, los anticuerpos se ajustaron a 1,0 mg/ml y se incubaron con 20 equiv. mol por sitio de conjugación de TAMRA-cadaverina y 0,5 equiv. mol de transglutaminasa microbiana (MTG) en tampón HEPES 100 mM pH 7,0 durante 3 h a 25 °C. La TAMRA-cadaverina no unida se eliminó mediante filtración en gel dos veces usando columnas de centrifugación y desalinización de 40 proteínas (Thermo Scientific) equilibradas con PBS. Se incubó una muestra sin anticuerpo y se trató de la misma manera para excluir la TAMRA-cadaverina que seguía libre tras la filtración en gel. Posteriormente se restó la fluorescencia débil de este control de la fluorescencia de las muestras de anticuerpo. La concentración de los anticuerpos conjugados con TAMRA-cadaverina se determinó mediante una curva patrón de TAMRA-cadaverina

que abarcaba de 9,72 a 0,19 μ M en PBS (40 μ l por pocillo) y la lectura de fluorescencia se determinó usando un lector de placas (Tecan Infinite M1000). El porcentaje de anticuerpos marcados/no marcados se calculó a partir de la concentración total de anticuerpos (determinada a 280 nm, **9**: PM = 148 211,72 g/mol ϵ 280 = 223 400 M-1m-1, **10**: PM = 148 259,55 g/mol ϵ 280 = 223 150 M-1m-1) asumiendo que cada anticuerpo marcado estaba conjugado con

- 5 dos restos TAMRA unidos a la etiqueta MTG en las cadenas pesadas. Por cuestiones analíticas, las reacciones se analizaron también mediante SDS-PAGE al 15 % y las cadenas pesadas marcadas con TAMRA se visualizaron mediante la lectura de fluorescencia.

Ejemplo 4

10

Experimentos de unión a células

Líneas celulares. Las células EBC-1 y CHO-K1 se cultivaron en DMEM con L-glutamina 4 mM (Sigma-Aldrich) y DMEM-F12 + GlutaMax™ (Gibco®), respectivamente, ambos suplementados con suero fetal bovino al 10 % (Sigma-15 Aldrich) a 37 °C y CO2 al 5 %.

Experimentos de unión a células. Los experimentos de unión a células se realizaron usando células EBC-1[3] que sobreexpresaban EGFR y células CHO-K1 negativas para EGFR en combinación con microscopio de fluorescencia confocal y citometría de flujo, respectivamente. Los pasos de lavado e incubación se realizaron a 4 °C usando PBS 20 con BSA al 1 %. Para los experimentos basados en microscopia, las células se crecieron sobre cubreobjetos de vidrio seguido del marcaje consecutivo con 100 nM de los respectivos conjugados de anticuerpo y conjugado estreptavidina-Alexa Fluor® 488 (Life Technologies) diluido 1:200. A continuación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se montaron con ProLong® Diamond Antifade Mountant con DAPI (Life Technologies) y se escanearon usando un microscopio confocal Leica TCS SP5 equipado con un objetivo 100× (Leica Microsystems). 25 Para la citometría de flujo se incubaron 2 × 105 células con 100 nM de los correspondientes conjugados de anticuerpo y en un paso consecutivo con conjugado estreptavidina-Alexa Fluor® 488 (Life Technologies) diluido 1:200. La fluorescencia de las células se determinó usando un separador celular BD Influx y el software BD FACS con detección de 2 × 104 eventos.

30 **Ejemplo 5:**

Bioconjugación de cetuximab (c225) usando mTG2 y el sustrato que comprende el donante de grupos amino GGG

Las variantes 9 y 10 de la cadena pesada de cetuximab (9: con la etiqueta MTG de la invención según la SEC ID N.º 35 90, 10: con la etiqueta MTG de la invención según la SEC ID N.º 246) con los restos de lisina terminales (K447) eliminados se conjugaron con biotina-cadaverina o GGGYK-biotina.

Las condiciones del ensayo para la realización de las reacciones de conjugación mediada por mTG2 fueron las siguientes:

40

<u>Condiciones del ensayo</u>	<u>Conc. [μM]</u>
Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM	1x

mTG (0,4 eq.)	1,364
Cetuximab (según la invención)	0,5 mg/ml
MBC/GGG-biotina/GGG-TAMRA/TAMRA-cadaverina (50 equivalentes molar)	170,4
Tiempo de incubación:	3 h a 22 °C

Tras la incubación durante 3 h a 22 °C, la reacción se detuvo mediante la adición de 2,5 µl de colorante de carga-SDS y la posterior desnaturalización a 98 °C durante 5 min. Se cargó un gel de SDS-poliacrilamida al 15 % con las muestras y se desarrolló a 300 V, 40 mA hasta que se logró la separación deseada (véase la figura 14B). Se realizó

- 5 la inmunotransferencia (12 V, 400 mA, 45 min). La detección de fluorescencia se realizó poniendo el gel de poliacrilamida en una pantalla de UV (λ = 260-280 nm) (figura 14C).

Resultados:

- 10 Solo el cetuximab que contenía la etiqueta MTG 1 o la etiqueta MTG 2 estaba marcado con fluorescencia, mientras que el cetuximab wt que no contenía las secuencias polipeptídicas de la invención según las SEC ID N.º 90 y SEC ID N.º 246 no estaba marcado con fluorescencia, lo que indicaba que las etiquetas MTG eran reconocidas de forma eficaz por mTG2.

15 **Ejemplo 6**

Reacciones de conjugación favorecidas por MTG

- Los conjugados anticuerpo-fármaco (CAF) se sintetizaron en reacciones catalizadas por MTG que contenían
20 1 mg/ml de cetuximab con etiqueta y con la SEC ID N.º 246 (p. ej., cetuximab que comprendía la SEC ID N.º 246 en el extremo carboxiterminal de cada una de las cadenas pesadas), 20 equivalentes de carga activa citotóxica 1-4 y 0,1 equivalentes de transglutaminasa microbiana (MTG). Las reacciones se realizaron en PBS pH 7,4 a 37 °C durante 16 h y se detuvieron mediante la adición de 1 volumen de tampón A de HIC.

25 **ANÁLISIS DE CAF MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDRÓFoba (HIC)**

- Los CAF se evaluaron mediante cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en una columna TSKgel Butyl-NPR (Tosoh Bioscience; 4,6 mm × 3,5 cm; 2,5 µm) usando un HPLC Infinity 1260 de Agilent. El método HIC se aplicó usando una fase móvil de NaH₂PO₄ 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 1,5 M, pH 7,5 (tampón A) y NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,5 (tampón B). Los CAF (45 µg) en (NH₄)₂SO₄ 0,75 M se cargaron y se eluyeron con un gradiente que consistía en 2,5 min de tampón B al 0 % seguido por un gradiente lineal en tampón B al 100 % durante 25 min con un caudal de 0,9 ml/min.

LISTADO DE SECUENCIAS

35

<110> Merck Patent GmbH

<120> Etiqueta transglutamina para bioconjugación específica de sitio eficiente

<130> PI5/150

5 <160> 303

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 7

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 1

Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly 1 5

20 <210> 2

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<220>

30 <221> XI

<222> (1)..(1)

<223> XI es un aminoácido hidrófobo (A, I, L, M, F, W, Y, V)

<220>

35 <221> X2

<222> (2)..(2)

<223> X2 es un aminoácido cargado negativamente (D, E)

<220>

40 <221> X3

<222> (3)..(3)

<223> X3 es C o N

<220>
<221> X4
<222> (11)..(11)
<223> X4 es C o N

5

<220>
<221> X5
<222> (12)..(12)
<223> X5 es uno de un aminoácido con una cadena lateral polar no cargada (S, T, N, Q)

10

<220>
<221> X6
<222> (13)..(13)
<223> X6 es un aminoácido cargado negativamente (D, E)

15

<400>
Xaa Xaa Xaa Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Xaa Xaa Xaa
1 5 10

20 <210> 3
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<220>
<221> XI

30 <222> (1)..(1)
<223> XI es un aminoácido hidrófobo (A, I, L, M, F, W, Y, V)

<220>
<221> X2

35 <222> (2)..(2)
<223> X2 es un aminoácido cargado negativamente (D, E)

<220>
<221> X5

40 <222> (12)..(12)
<223> X5 es un aminoácido con una cadena lateral polar no cargada (S, T, N, Q)

<220>

<221> X6
 <222> (13)..(13)
 <223> X6 es un aminoácido cargado negativamente (D, E)

5 <400> 3

Xaa Xaa Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Xaa Xaa

1 5 10

10 <210> 4

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<220>

<221> X1

20 <222> (1)..(1)

<223> X1 es un aminoácido hidrófobo (A, I, L, M, F, W, Y, V)

<220>

<221> X2

25 <222> (2)..(2)

<223> X2 es un aminoácido cargado negativamente (D, E)

<220>

<221> X5

30 <222> (12)..(12)

<223> X5 es un aminoácido con una cadena lateral polar no cargada (S, T, N, Q)

<220>

<221> X6

35 <222> (13)..(13)

<223> X6 es un aminoácido cargado negativamente (D, E)

<400> 4

40 Xaa Xaa Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Xaa Xaa

1 5 10

<210> 5

<211> 13
 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<220>
 <221> X1

10 <222> (1)..(1)
 <223> X1 es un aminoácido hidrófobo (A, I, L, M, F, W, Y, V)

<220>
 <221> X2

15 <222> (2)..(2)
 <223> X2 es un aminoácido cargado negativamente (D, E)

220>
 <221> X5

20 <222> (12)..(12)
 <223> X5 es un aminoácido con una cadena lateral polar no cargada (S, T, N, Q)

<220>
 <221> X6

25 <222> (13)..(13)
 <223> X6 es un aminoácido cargado negativamente (D, E)

<400> 5

30 Xaa Xaa Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 6
 <211> 13

35 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia artificial

40 <221> X1
 <222> (1)..(1)
 <223> X1 es un aminoácido hidrófobo (A, I, L, M, F, W, Y, V)

<220>
<221> X2
<222> (2)..(2)
<223> X2 es un aminoácido cargado negativamente (D, E)

5

220>
<221> X5
<222> (12)..(12)
<223> X5 es un aminoácido con una cadena lateral polar no cargada (S, T, N, Q)

10

<220>
<221> X6
<222> (13)..(13)
<223> X6 es un aminoácido cargado negativamente (D, E)

15

<400> 6

Xaa Xaa Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Xaa Xaa

1 5 10

20

<210> 7
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 7

30

Ala Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

1 5 10

<210> 8
35 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 8

Val Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

1 5 10

<210> 9

5 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 9

Ile Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

15 1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PROT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25 <400> 10

Leu Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

1 5 10

30 <210> 11

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 11

40 Met Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

1 5 10

<210> 12

<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 12

10 Gly Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp
1 5 10

<210> 13
<211> 13
15 <212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 13

Ala Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp
1 5 10

25 <210> 14

<211> 13
<212> PROT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

35 <400> 14

Val Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp
1 5 10

<210> 15
40 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 15
5
Ile Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp
1 5 10

<210> 16
10 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 16
Leu Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp
20 1 5 10

<210> 17
<211> 13
<212> PROT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

30 <400> 17
Met Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp
1 5 10

35 <210> 18
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 18

Gly Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

1 5 10

5 <210> 19

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 19

15 Ala Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

<210> 20

<211> 13

20 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25

<400> 20

Val Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

30

<210> 21

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 21

40

Ile Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

<210> 22
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 22

10

Leu Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp
1 5 10

<210> 23
15 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 23

Met Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp
1 5 10

25

<210> 24
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 24

35

Gly Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp
1 5 10

<210> 25
40 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 25

5

Ala Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

<210> 26

10 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 26

20 Val Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PROT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

30 <400> 27

Ile Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

<210> 28

35 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 28

Leu Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

<210> 29

5 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 29

Met Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

15 1 5 10

<210> 30

<211> 13

<212> PROT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25 <400> 30

Gly Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

30 <210> 31

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 31

40 Ala Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

<210> 32

<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 32
Val Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

10 1 5 10

<210> 33
<211> 13
<212> PROT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 33
Ile Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu
1 5 10

25 <210> 34
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 34
Leu Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

35 1 5 10

<210> 35
<211> 13
40 <212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 35

5 Met Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

<210> 36

<211> 13

10 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

15

<400> 36

Gly Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

20 <210> 37

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 37

30 Ala Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

<210> 38

<211> 13

35 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

40

<400> 38

Val Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

<210> 39

<211> 13

5 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

10

<400> 39

Ile Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

15

<210> 40

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 40

25

Leu Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

<210> 41

30 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 41

Met Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

40

<210> 42

<211> 13

<212> PROT

5 <213> Secuencia artificial

10 <220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 42

Gly Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

25 <210> 43

<211> 13

<212> PROT

30 <213> Secuencia artificial

35 <220>

40 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

45 <400> 43

50 Ala Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

55 <210> 44

60 <211> 13

<212> PROT

65 <213> Secuencia artificial

70 <220>

75 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

80 <400> 44

85 Val Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

90 1 5 10

95 <210> 45

<211> 13

<212> PROT

100 <213> Secuencia artificial

105 <220>

110 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 45

Ile Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

5 1 5 10

<210> 46

<211> 13

<212> PROT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

15 <400> 46

Leu Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

20 <210> 47

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 47

30 Met Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

<210> 48

<211> 13

35 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

40

<400> 48

Gly Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

<210> 49

<211> 13

5 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

10

<400> 49

Ala Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

15

<210> 50

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 50

25

Val Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

<210> 51

30 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 51

Ile Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

40 1 5 10

<210> 52

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 52

Leu Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

10 1 5 10

<210> 53

<211> 13

<212> PROT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 53

Met Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

25 <210> 54

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 54

35 Gly Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

<210> 55

<211> 13

40 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 55

5 Ala Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp
1 5 10

<210> 56

<211> 13

10 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

15

<400> 56

Val Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

20

<210> 57

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 57

30

Ile Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

<210> 58

35 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 58

Leu Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

<210> 59

5

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 59

15 Met Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

<210> 60

<211> 13

20 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25

<400> 60

Gly Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

30

<210> 61

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 61

40

Ala Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

<210> 62
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 62

10

Val Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1	5	10
---	---	----

<210> 63
15 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 63

Ile Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

25 1 5 10

<210> 64
<211> 13
<212> PROT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

35 <400> 64

Leu Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1	5	10
---	---	----

40 <210> 65
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

5 <400> 65

Met Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

10 <210> 66

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 66

20 Gly Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

<210> 67

<211> 13

25 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

30 <400> 67

Ala Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

35 <210> 68

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 68

Val Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

5 <210> 69

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 69

15 Ile Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

<210> 70

<211> 13

20 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25

<400> 70

Leu Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

30

<210> 71

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 71

40

Met Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

<210> 72
 <211> 13
 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

 <400> 72
 10 Gly Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp
 1 5 10

 <210> 73
 <211> 13
 15 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial
 20 <400> 73

 Ala Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp
 1 5 10
 25 <210> 74
 <211> 13
 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

 <400> 74
 35 Val Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp
 1 5 10

 <210> 75
 40 <211> 13
 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 75

5

Ile Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

<210> 76

10 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 76

Leu Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp
20 1 5 10

<210> 77

<211> 13

<212> PROT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

30 <400> 77

Met Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

<210> 78

35 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 78

Gly Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

<210> 79

5 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 79

Ala Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

15 1 5 10

<210> 80

<211> 13

<212> PROT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25 <400> 80

Val Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

1 5 10

30 <210> 81

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 81

40 Ile Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

1 5 10

<210> 82

<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 82

10 Leu Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu
1 5 10

<210> 83
<211> 13
15 <212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 83

Met Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu
1 5 10

25 <210> 84
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 84

35 Gly Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu
1 5 10

<210> 85
40 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 85
5
Ala Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu
1 5 10

<210> 86
10 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 86
Val Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu
1 5 10
20
<210> 87
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 87
30
Ile Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu
1 5 10

<210> 88
35 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 88

Leu Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

1 5 10

<210> 89

5 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 89

Met Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

15 1 5 10

<210> 90

<211> 13

<212> PROT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25 <400> 90

Gly Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

1 5 10

30 <210> 91

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 91

40 Ala Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

1 5 10

<210> 92

<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 92

10 Val Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu
1 5 10

<210> 93
<211> 13
15 <212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 93

Ile Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu
1 5 10

25 <210> 94
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 94

35 Leu Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu
1 5 10

<210> 95
40 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 95
5
Met Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu
1 5 10

<210> 96
10 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 96
20 Gly Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu
1 5 10

<210> 97
<211> 13
<212> PROT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

30 <400> 97
Ala Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu
1 5 10

35 <210> 98
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 98

ES 2 855 998 T3

Val Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

1 5 10

5 <210> 99

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 99

15 Ile Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

1 5 10

<210> 100

<211> 13

20 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25

<400> 100

Leu Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

1 5 10

30

<210> 101

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 101

40

Met Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

1 5 10

<210> 102
 <211> 13
 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

 <400> 102
 10
 Gly Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu
 1 5 10

 <210> 103
 15 <211> 13
 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

 <400> 103

 Ala Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp
 25 1 5 10

 <210> 104
 <211> 13
 <212> PROT
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

 35 <400> 104

 Val Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp
 1 5 10

 40 <210> 105
 <211> 13
 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

5 <400> 105

Ile Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

1 5 10

10

<210> 106

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 106

20

Leu Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

1 5 10

<210> 107

25 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 107

Met Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

35 1 5 10

<210> 108

<211> 13

<212> PROT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 108

Gly Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

5 1 5 10

<210> 109

<211> 13

<212> PROT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

15 <400> 109

Ala Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

1 5 10

20 <210> 110

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 110

30 Val Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

1 5 10

<210> 111

<211> 13

35 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

40 <400> 111

Ile Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

1 5 10

<210> 112

<211> 13

5 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

10

<400> 112

Leu Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

1 5 10

15

<210> 113

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 113

25

Met Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

1 5 10

<210> 114

30 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 114

Gly Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

40 1 5 10

<210> 115

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 115

Ala Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

10 1 5 10

<210> 116

<211> 13

<212> PROT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 116

Val Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

1 5 10

25 <210> 117

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 117

35 Ile Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

1 5 10

<210> 118

<211> 13

40 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 118

5 Leu Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp
1 5 10

<210> 119

<211> 13

10 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

15

<400> 119

Met Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

1 5 10

20

<210> 120

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 120

30

Gly Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

1 5 10

<210> 121

35 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 121

Val Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

1 5 10

<210> 122

5 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 122

Ile Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

15 1 5 10

<210> 123

<211> 13

<212> PROT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25 <400> 123

Leu Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

1 5 10

30 <210> 124

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 124

40 Met Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

1 5 10

<210> 125

<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 125

10 Gly Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp
1 5 10

<210> 126
<211> 13
15 <212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 126

Ala Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu
1 5 10

25 <210> 127
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 127

35 Val Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu
1 5 10

<210> 128
40 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 128

5

Ile Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

<210> 129

10 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 129

Leu Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu
20 1 5 10

<210> 130

<211> 13

<212> PROT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

30 <400> 130

Met Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu
1 5 10

35 <210> 131

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 131

Gly Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

5 <210> 132

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 132

15 Ala Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

<210> 133

<211> 13

20 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25

<400> 133

Val Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

30

<210> 134

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 134

40

Ile Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

<210> 135
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 135

10

Leu Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu
1 5 10

<210> 136

15 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 136

Met Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu
25 1 5 10

<210> 137

20 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

35 <400> 137

Gly Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu
1 5 10

40 <210> 138
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

5 <400> 138

Ala Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

10 <210> 139

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 139

20 Val Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

<210> 140

<211> 13

25 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

30 <400> 140

Ile Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

35 <210> 141

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

5
<400> 141

Leu Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

10

<210> 142

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 142

20

Met Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

<210> 143

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 143

Gly Asp Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

30 1 5 10

<210> 144

<211> 13

<212> PROT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

40 <400> 144

Ala Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

<210> 145
 <211> 13
 <212> PROT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

10 <400> 145

Val Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu
 1 5 10

15 <210> 146
 <211> 13
 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 146

25 Ile Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu
 1 5 10

<210> 147
 <211> 13
 30 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

35 <400> 147

Leu Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu
 1 5 10

40 <210> 148
 <211> 13
 <212> PROT

5 <213> Secuencia artificial

10 <220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 148

Met Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

25 <210> 149

<211> 13

<212> PROT

30 <213> Secuencia artificial

35 <220>

40 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

45 <400> 149

50 Gly Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

55 <210> 150

60 <211> 13

<212> PROT

65 <213> Secuencia artificial

70 <220>

75 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

80 <400> 150

85 Ala Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

90 1 5 10

95 <210> 151

<211> 13

<212> PROT

100 <213> Secuencia artificial

105 <220>

110 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 151

Val Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

5 1 5 10

<210> 152

<211> 13

<212> PROT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

15 <400> 152

Ile Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

1 5 10

20 <210> 153

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 153

30 Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

1 5 10

<210> 154

<211> 13

35 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

40

<400> 154

Met Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

1 5 10

<210> 155

<211> 13

5 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

10

<400> 155

Gly Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

1 5 10

15

<210> 156

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 156

25

Ala Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

1 5 10

<210> 157

30 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 157

Val Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

40 1 5 10

<210> 158

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 158

Ile Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

10 1 5 10

<210> 159

<211> 13

<212> PROT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 159

Leu Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

1 5 10

25 <210> 160

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 160

35 Met Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp

1 5 10

<210> 161

<211> 13

40 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 161

5 Gly Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Asp
1 5 10

<210> 162

<211> 13

10 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

15

<400> 162

Ala Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

20

<210> 163

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 163

30

Val Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

<210> 164

35 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 164

Ile Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

<210> 165

5 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 165

Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

15 1 5 10

<210> 166

<211> 13

<212> PROT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25 <400> 166

Met Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

30 <210> 167

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 167

40 Gly Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

<210> 168

<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 168

10 Ala Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp
1 5 10

<210> 169
<211> 13
15 <212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 169

Val Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp
1 5 10

25 <210> 170
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 170

35 Ile Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp
1 5 10

<210> 171
40 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 171

5

Leu Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

<210> 172

10 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 172

Met Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

20 1 5 10

<210> 173

<211> 13

<212> PROT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

30 <400> 173

Gly Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Asp

1 5 10

35 <210> 174

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 174

ES 2 855 998 T3

Ala Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

5 <210> 175

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 175

15 Val Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

<210> 176

<211> 13

20 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25

<400> 176

Ile Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

30 1 5 10

<210> 177

<211> 13

<212> PROT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

40 <400> 177

Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

<210> 178
<211> 13
<212> PROT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

10 <400> 178

Met Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu
1 5 10

15 <210> 179
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 179

25 Gly Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu
1 5 10

<210> 180
<211> 13
30 <212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

35 <400> 180

Ala Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu
1 5 10

40 <210> 181
<211> 13
<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

5

<400> 181

Val Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

10

<210> 182

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 182

20

Ile Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

<210> 183

25 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 183

Leu Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

35 1 5 10

<210> 184

<211> 13

<212> PROT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 184

Met Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

5 1 5 10

<210> 185

<211> 13

<212> PROT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

15 <400> 185

Gly Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Ser Glu

1 5 10

20 <210> 186

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 186

30 Ala Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

<210> 187

<211> 13

35 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

40

<400> 187

Val Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

<210> 188

<211> 13

5 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

10

<400> 188

Ile Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

15

<210> 189

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 189

25

Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

<210> 190

30 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 190

Met Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

40 1 5 10

<210> 191

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 191

Gly Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

10 1 5 10

<210> 192

<211> 13

<212> PROT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 192

Ala Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

25 <210> 193

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 193

35 Val Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

<210> 194

<211> 13

40 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 194

5 Ile Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu
1 5 10

<210> 195

<211> 13

10 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

15

<400> 195

Leu Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

20

<210> 196

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 196

30

Met Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

<210> 197

35 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 197

Gly Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Ser Glu

1 5 10

<210> 198

5 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 198

Ala Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

15 1 5 10

<210> 199

<211> 13

<212> PROT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25 <400> 199

Val Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

30 <210> 200

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 200

40 Ile Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

<210> 201

<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 201

10 Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp
1 5 10

<210> 202
<211> 13
15 <212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 202

Met Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp
1 5 10

25 <210> 203
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 203

35 Gly Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp
1 5 10

40 <210> 204
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

5 <400> 204

Ala Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

10 <210> 205

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 205

20 Val Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

<210> 206

<211> 13

25 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

30 <400> 206

Ile Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

35 <210> 207

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 207

Leu Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

5

<210> 208

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 208

15

Met Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

1 5 10

<210> 209

20 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 209

Gly Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Asp

30 1 5 10

<210> 210

<211> 13

<212> PROT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

40 <400> 210

Ala Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

<210> 211
<211> 13
<212> PROT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

10 <400> 211

Val Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp
1 5 10

15 <210> 212
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 212
Ile Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp
25 1 5 10

25 <210> 213
<211> 13
<212> PROT
30 <213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

35 <400> 213

Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp
1 5 10

40 <210> 214
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

5 <400> 214

Met Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

10 <210> 215

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 215

20 Gly Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

<210> 216

<211> 13

25 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

30

<400> 216

Ala Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

35

<210> 217

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 217

Val Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

5

<210> 218

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 218

15

Ile Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

<210> 219

20 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 219

Leu Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

30 1 5 10

<210> 220

<211> 13

<212> PROT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

40 <400> 220

Met Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp

1 5 10

<210> 221
<211> 13
<212> PROT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

10 <400> 221

Gly Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Asp
1 5 10

15 <210> 222
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 222

25 Ala Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu
1 5 10

<210> 223
<211> 13
30 <212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

35 <400> 223

Val Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu
1 5 10

40 <210> 224
<211> 13
<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

5

<400> 224

Ile Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

1 5 10

10

<210> 225

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 225

20

Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

1 5 10

<210> 226

25 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 226

Met Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

35 1 5 10

<210> 227

<211> 13

<212> PROT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 227

Gly Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

5 1 5 10

<210> 228

<211> 13

<212> PROT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

15 <400> 228

Ala Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

1 5 10

20 <210> 229

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 229

30 Val Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

1 5 10

<210> 230

<211> 13

35 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

40

<400> 230

Ile Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

1 5 10

<210> 231

<211> 13

5 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

10

<400> 231

Leu Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

1 5 10

15

<210> 232

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 232

25

Met Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

1 5 10

<210> 233

30 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 233

Gly Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

40 1 5 10

<210> 234

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 234

Ala Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

10 1 5 10

<210> 235

<211> 13

<212> PROT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 235

Val Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

1 5 10

25 <210> 236

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 236

35 Ile Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

1 5 10

<210> 237

<211> 13

40 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 237

5 Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu
1 5 10

<210> 238

<211> 13

10 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

15

<400> 238

Met Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

1 5 10

20

<210> 239

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 239

30

Gly Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

1 5 10

<210> 240

35 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 240

Ala Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

1 5 10

<210> 241

5 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 241

Val Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

15 1 5 10

<210> 242

<211> 13

<212> PROT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25 <400> 242

Ile Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

1 5 10

30 <210> 243

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 243

40 Leu Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

1 5 10

<210> 244

<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 244

10 Met Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu
1 5 10

<210> 245
<211> 13
15 <212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 245

Gly Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu
1 5 10

25 <210> 246
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 246

35 Ala Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp
1 5 10

<210> 247
40 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 247

5

Val Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

1 5 10

10 <210> 248

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 248

20 Ile Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

1 5 10

<210> 249

<211> 13

25 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

30

<400> 249

Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

1 5 10

35

<210> 250

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

250

Met Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

1 5 10

5

251

13

PROT

Secuencia artificial

10

220

Secuencia de aminoácidos artificial

251

15

Gly Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

1 5 10

252

20 13

PROT

Secuencia artificial

220

25 223 Secuencia de aminoácidos artificial

252

Ala Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

30 1 5 10

253

211 13

PROT

35 213 Secuencia artificial

220

223 Secuencia de aminoácidos artificial

40 253

Val Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp

1 5 10

<210> 254
 <211> 13
 <212> PROT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

10 <400> 254

Ile Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp
 1 5 10

15 <210> 255
 <211> 13
 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 255

25 Leu Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp
 1 5 10

<210> 256
 <211> 13
 30 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

35 <400> 256

Met Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Asp
 1 5 10

40 <210> 257
 <211> 13
 <212> PROT

<400> 260

Ile Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

1 5 10

5

<210> 261

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 261

15

Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

1 5 10

<210> 262

20 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 262

Met Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

30 1 5 10

<210> 263

<211> 13

<212> PROT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

40 <400> 263

Gly Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

1 5 10

<210> 264
 <211> 13
 <212> PROT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

10 <400> 264

Ala Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp
 1 5 10

15 <210> 265
 <211> 13
 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 265

25 Val Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp
 1 5 10

<210> 266
 <211> 13
 30 <212> PROT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

35 <400> 266

Ile Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp
 1 5 10

40 <210> 267
 <211> 13
 <212> PROT

5 <213> Secuencia artificial

10 <220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 267

Leu Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

1 5 10

25 <210> 268

<211> 13

<212> PROT

30 <213> Secuencia artificial

35 <220>

40 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

45 <400> 268

50 Met Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

1 5 10

55 <210> 269

60 <211> 13

<212> PROT

65 <213> Secuencia artificial

70 <220>

75 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

80 <400> 269

85 Gly Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

90 1 5 10

95 <210> 270

<211> 13

<212> PROT

100 <213> Secuencia artificial

105 <220>

110 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 270

Ala Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

5 1 5 10

<210> 271

<211> 13

<212> PROT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

15 <400> 271

Val Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

20 <210> 272

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 272

30 Ile Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

<210> 273

<211> 13

35 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

40 <400> 273

Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

<210> 274

<211> 13

5 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

10

<400> 274

Met Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

15

<210> 275

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 275

25

Gly Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

<210> 276

30 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 276

Ala Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

40 1 5 10

<210> 277

<211> 13

<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 277

Val Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

10 1 5 10

<210> 278
<211> 13
<212> PROT
15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 278

Ile Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

25 <210> 279
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 279

35 Leu Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

<210> 280
<211> 13
40 <212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 280

5 Met Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

<210> 281

<211> 13

10 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

15

<400> 281

Gly Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Asn Glu

1 5 10

20

<210> 282

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 282

30

Ala Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

<210> 283

35 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 283

Val Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

<210> 284

5 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 284

Ile Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

15 1 5 10

<210> 285

<211> 13

<212> PROT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

25 <400> 285

Leu Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

30 <210> 286

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 286

40 Met Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

<210> 287

<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 287

10 Gly Asp Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu
1 5 10

<210> 288
<211> 13
15 <212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

20 <400> 288

Ala Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu
1 5 10

25 <210> 289
<211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 289

35 Val Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu
1 5 10

<210> 290
40 <211> 13
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 290

5

Ile Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

<210> 291

10 <211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 291

20 Leu Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

<210> 292

<211> 13

25 <212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

30

<400> 292

Met Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

35

<210> 293

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

5
<400> 293

Gly Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Glu

1 5 10

10

<210> 294

<211> 13

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 294

20

Ala Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Asn Asp

1 5 10

<210> 295

25 <211> 8

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia de aminoácidos artificial

<400> 295

30

Gly Gly Gly Ser Leu Leu Gln Gly 1 5

<210> 296

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador para PCR

<400> 296

40 tggctgaacg gcaaagagta c 21

<210> 297

<211> 40

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador para PCR

<400> 297
cctgaaaagta ggtgcactcg ccggccagggc tcagggacag 40

10 <210> 298
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador para PCR

<400> 298
cgggggatcc tcattcggtg cagccgtagg cctgaaaagta ggtgcactcg 50

20 <210> 299
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador para PCR

<400> 299
30 ctgaaaagtag gtgttctcgc cgccaggct cagggacag 39

<210> 300
<211> 50
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR

40 <400> 300
cgggggatcc tcattcggtg ttggccgtagg cctgaaaagta ggtgttctcg 50
<210> 301

<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos artificial

<220>
<221> misc_feature

10 <222> (1)..(9)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature

15 <222> (12)..(12)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature

20 <222> (24)..(24)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature

25 <222> (30)..(39)
<223> n es a, c, g o t

<400> 301
nnnnnnnnna cntayttyca rgcntayggn nnnnnnnnn 39

30 <210> 302
<211> 5
<212> PROT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<220>

40 <221> X
<222> (3)..(3)
<223> X = D, E, A, N, Q o K

<400> 302

Leu Pro Xaa Thr Gly

1 5

5

<210> 303

<211> 5

<212> PROT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos artificial

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Lisina unida covalentemente a biotina

<400> 303

20

Gly Gly Gly Tyr Lys

1 5

REIVINDICACIONES

1. Proteína que comprende al menos una secuencia donante de grupos amino que contiene acilglutamina unida a través de un enlace γ -glutamilamida a un sustrato que comprende un donante de grupos amino, en la que la secuencia donante de aminoácidos que contiene acilglutamina comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2 ($X_1X_2X_3$ TYFQAYG $X_4X_5X_6$), donde
 - 5 X1 es un aminoácido hidrófobo,
 - X2 es un aminoácido cargado negativamente,
 - 10 X3 es C o N,
 - X4 es C o N,
 - X5 es uno de un aminoácido con una cadena lateral polar no cargada, y
 - X6 es un aminoácido cargado negativamente.
- 15 2. Proteína según la reivindicación 1, en la que el sustrato que comprende el donante de grupos amino comprende al menos un grupo ϵ -amino o al menos un tripéptido que contiene la secuencia GGG con un grupo amino primario aminoterminal.
3. Proteína según la reivindicación 1 o 2, en la que el sustrato que comprende el donante de grupos amino es
 - 20 un resto de lisina, un derivado de lisina o un polipéptido que comprende al menos un resto de lisina.
4. Proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el sustrato que comprende el donante de grupos amino está unido covalentemente a una molécula adicional.
- 25 5. Proteína según la reivindicación 4, en la que la molécula adicional es un colorante, radioisótopo, fármaco, ribozima, nanocuerpo, enzima o enlazador.
6. Proteína según la reivindicación 5, en la que el enlazador es escindible o no escindible, y en la que el enlazador está acoplado o unido covalentemente a un colorante, radioisótopo o citotoxina.
- 30 7. Proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que
 - X1 es uno cualquiera de A, V, I, L, M o G,
 - X2 es uno de D o E,
 - 35 X3 es C,
 - X4 es C o N,
 - X5 es S, T o N,
 - X6 es uno de D o E.
- 40 8. Proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que
 - X1 es uno cualquiera de A, V, I, L, M o G,

X2 es uno de D o E,
X3 es C,
X4 es C,
X5 es S, T o N,
5 X6 es uno de D o E.

9. Proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que

X1 es uno cualquiera de A, V, I, L, M o G,
10 X2 es E,
X3 es C,
X4 es C,
X5 es T, y
X6 es E.

15 10. Proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que

X1 es G,
X2 es E,
20 X3 es C,
X4 es C,
X5 es T, y
X6 es E. (SEC ID N.º 90).

25 11. Proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la proteína es una de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, dominio Fc, una estructura no inmunoglobulina o enzima.

12. Método para acoplar covalentemente un sustrato que comprende un donante de grupos amino a un
30 donante de aminoácidos que contiene acilglutamina que comprende una secuencia polipeptídica según la SEC ID N.º 2, que comprende los pasos de:

35 • poner en contacto dicho sustrato que comprende un donante de grupos amino y un donante de aminoácidos que contiene acilglutamina en presencia de transglutaminasa, preferiblemente mTG2, para obtener una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

13. Método según la reivindicación 12, en el que el donante de aminoácidos que contiene acilglutamina es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, una estructura no inmunoglobulina o enzima.

40 14. Método según la reivindicación 13, en el que el sustrato que comprende el donante de grupos amino está acoplado o unido covalentemente a un colorante, fármaco, ribozima, nanocuerpo, enzima o enlazador.

15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que el enlazador es escindible o no escindible y en el que el enlazador está acoplado a un colorante, radioisótopo o citotoxina.
16. Proteína que se puede obtener mediante un método según el método de una cualquiera de las 5 reivindicaciones 12-15.
17. Uso de una secuencia polipeptídica según la SEC ID N.º 2 en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 12-15.
- 10 18. Proteína que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2.
19. Polipéptido según la SEC ID N.º 2.
20. Polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica según la SEC ID N.º 2.
- 15 21. 20. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, anticuerpo bivalente o anticuerpo VHH que comprende al menos una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N.º 2.
22. 20. Anticuerpo según la reivindicación 21, en el que el anticuerpo está acoplado covalentemente a al menos un enlazador según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 12-15.

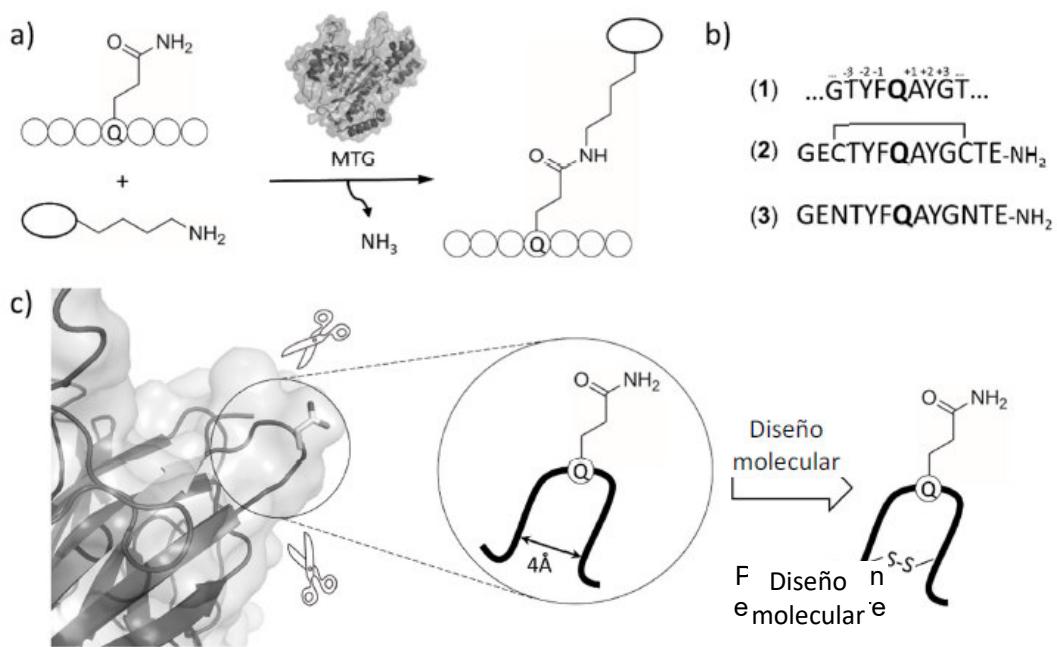


Figura 1

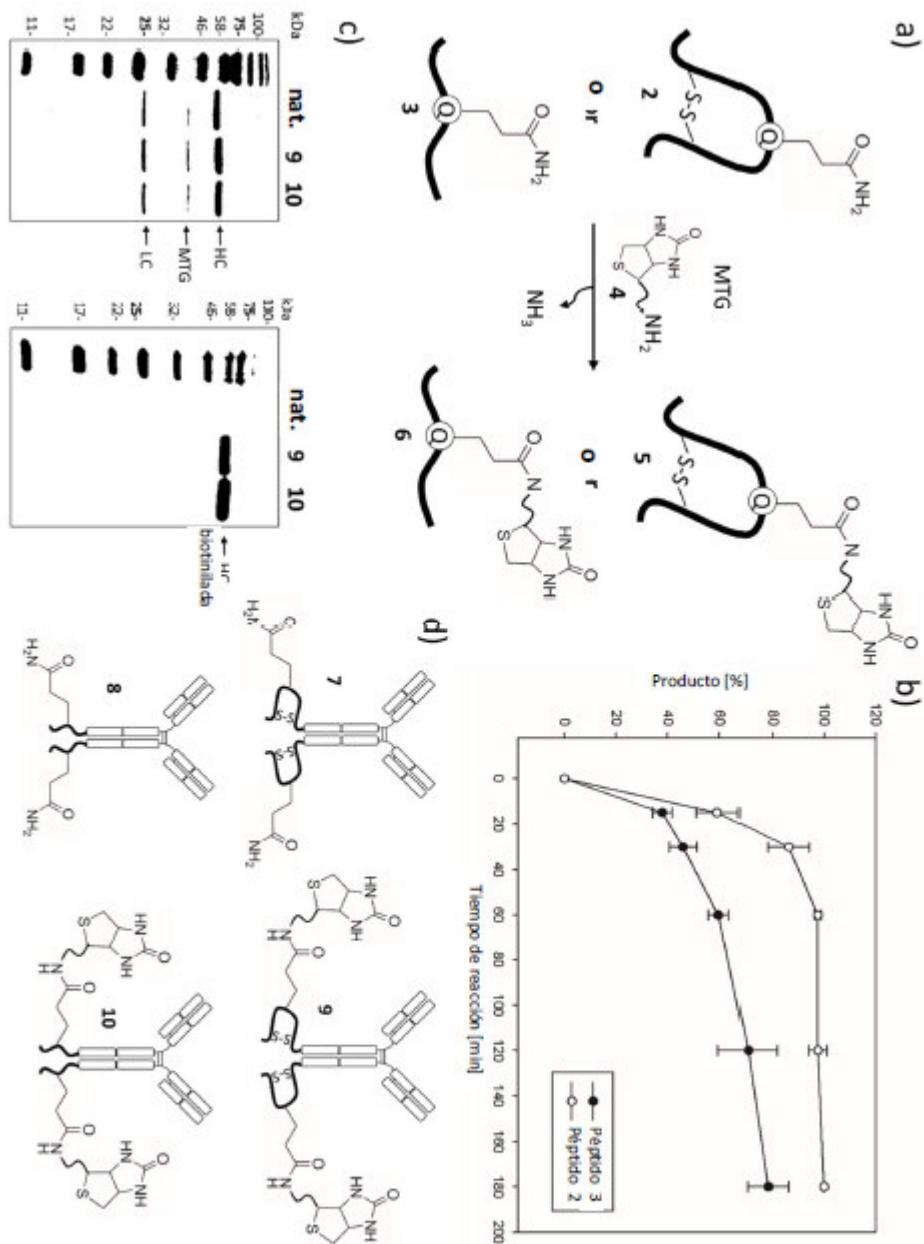


Figura 2

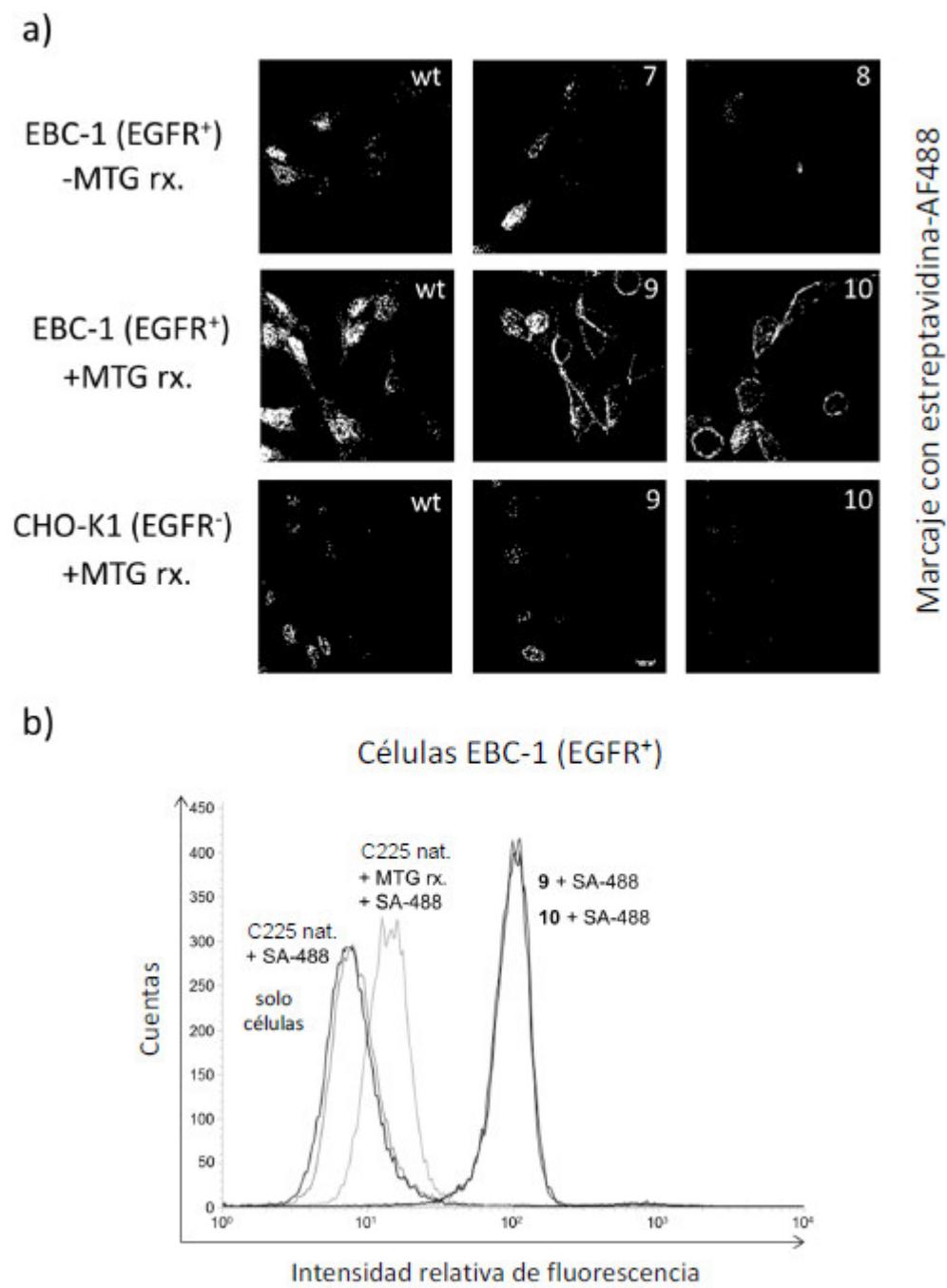


Figura 3

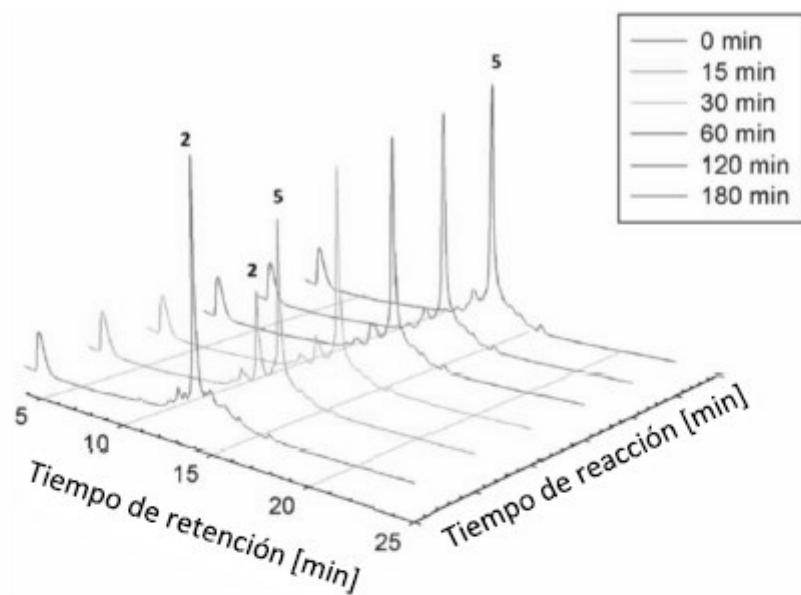


Figura 4

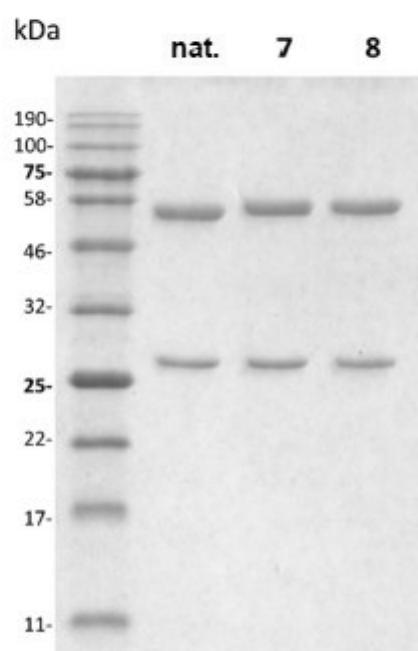


Figura 5

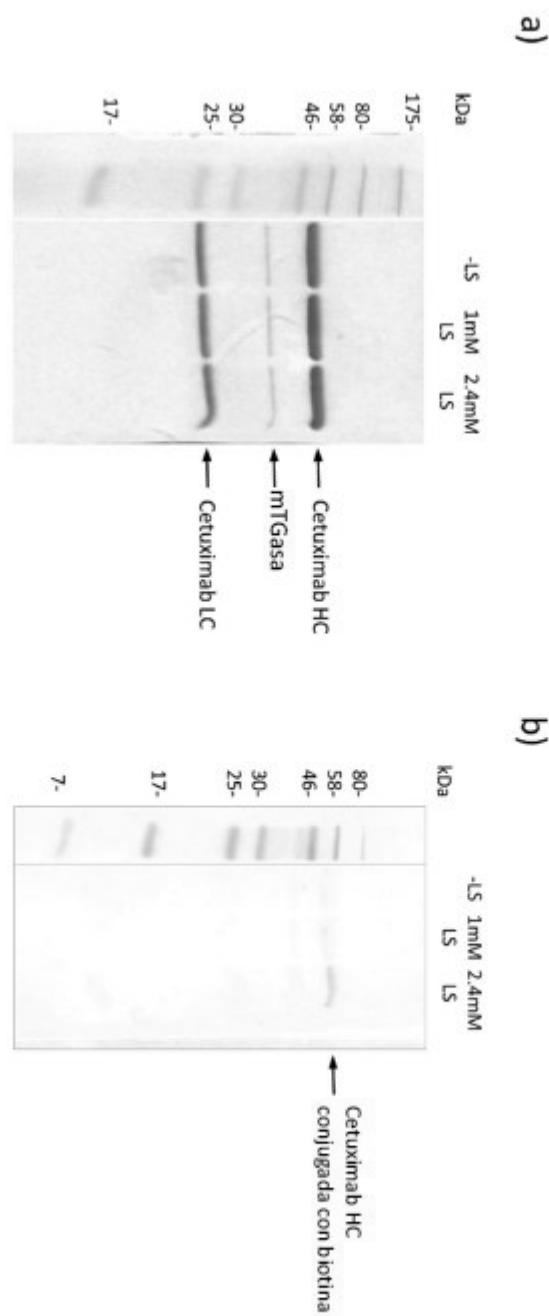


Figura 6

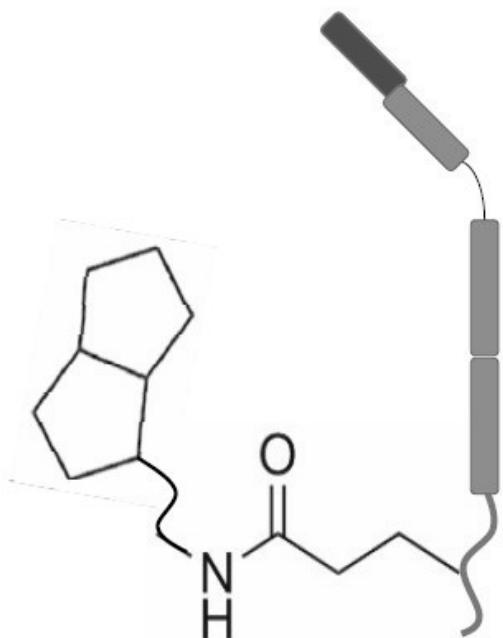


Figura 7

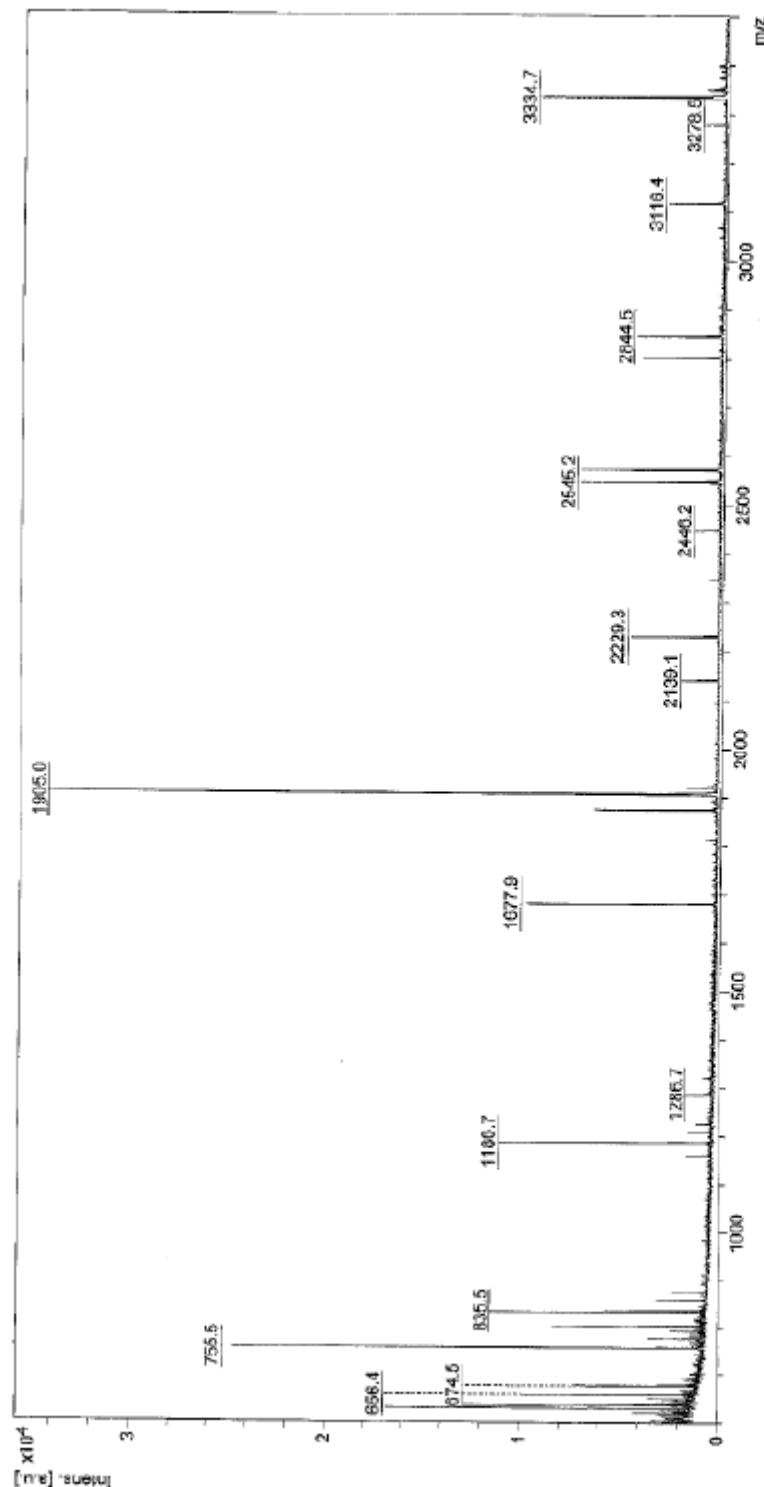


Figura 8

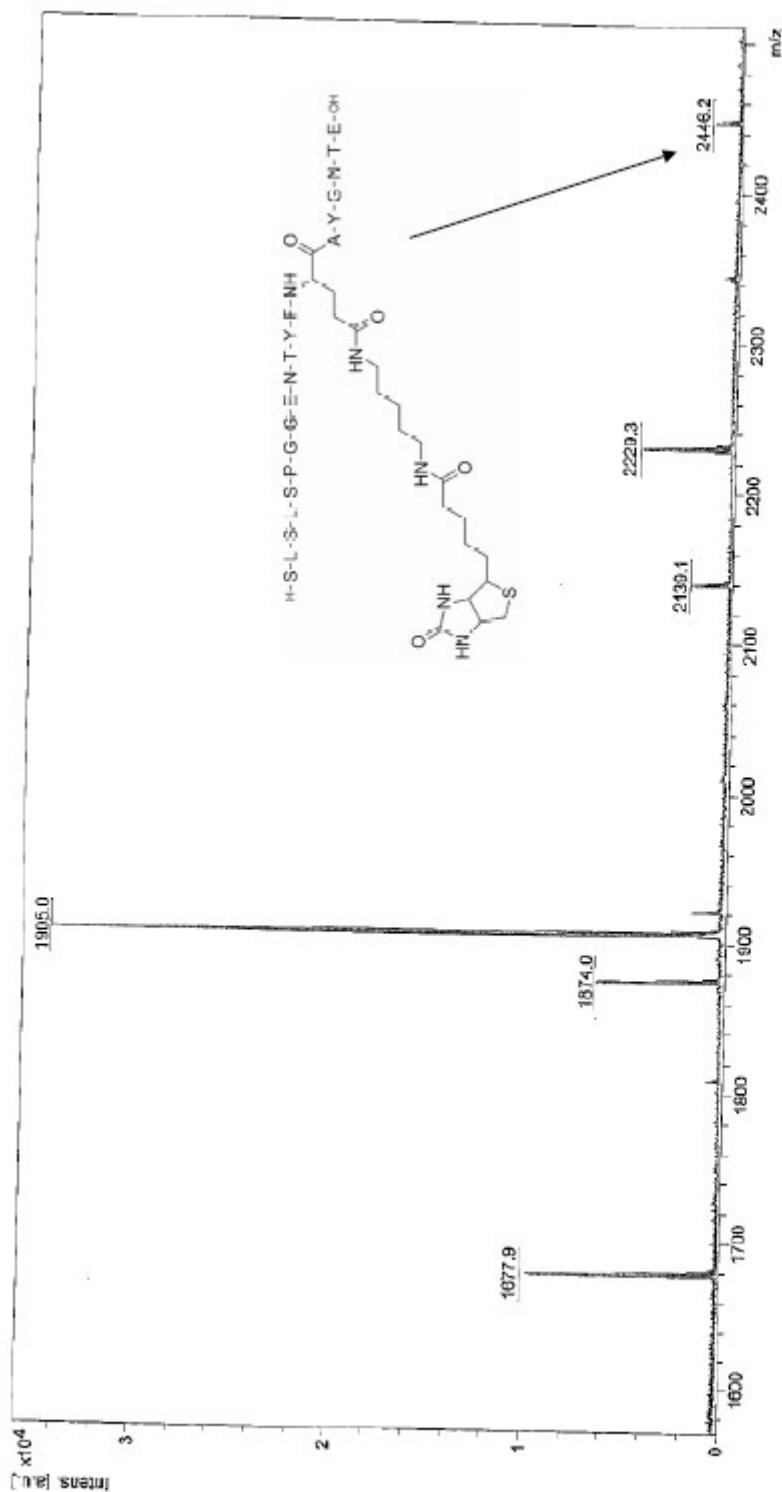


Figura 9



Figura 10A

Cobertura de restos: 56 % [261 de 464]

Coincidencias de péptidos: 14 [12] Modificados: 6 [6] No identificados: 8

Péptidos identificados sin modificaciones:

entrada encontr. desv. mc	de-a secuencia	
628,400 / 627,370 -0,022	1 216-220 RVEPK	
656,400 / 655,377 -0,016	1 344-349 AKGQPR	Escisión omitida
755,500 / 754,401 -0,091	0 76-81 SQVFFK	
835,500 / 834,427 -0,066	0 254-260 DTLMSR	Omisión de metOx
1186,700 / 1185,639 -0,053	0 124-135 GPSVFPLAPSSK	
1286,700 / 1285,667 -0,026	0 350-360 EPQVYTLPPSR	
1677,900 / 1676,795 -0,098	0 280-293 FNWYVDGVEVHNAK	
1874,000 / 1872,915 -0,078	0 398-414 TPPVLDSDGSFFLYSK	
1874,000 / 1871,963 -1,030	1 350-365 EPQVYTLPPSRDELTK	
1905,000 / 1904,121 0,128	3 332-349 ALPAPIEKTIKAKGQPR	Escisión omitida
2229,300 / 2227,200 -1,093	1 307-325 VVSVLTVLHQDWLNGKEYK	
2545,200 / 2544,422 0,230	5 323-345 EYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK	Escisión omitida
2545,200 / 2543,124 -1,069	0 376-397 GFYPSDIAVEWESNGQOPENIYK	
2570,290 / 2569,224 -0,059	0 44-66 GLEWLGVIVSGGNTDYNTPFTSR	

Péptidos identificados con modificaciones:

1161,700 / 1102,593 -0,070	0 366-375 CAM	NQVSLTCLVK
2139,100 / 2079,991 -0,073	0 261-279 CAM	TPEVTCVVDVSHEDPEVK
2446,200 / 2133,949 -0,077	-1 445-464 MBC	SLSLSPGGENTYFQAYGNT
2801,300 / 2742,231 -0,033	0 422-444 CAM	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
2844,500 / 2727,392 -0,042	0 228-253 CAM	THTCPPCPAPEL...GPSVFLPPKPK
3334,700 / 3159,547 -0,058	1 224-253 CAM	SCDKTHTCPPCP...GPSVFLPPKPK

Valores de masa no identificados:

674,50 777,40 804,30 860,50 876,50
1208,70 3116,40 3278,50

Lista de masa comprobada en cuanto a modificaciones [3*]:

CAM (58,029 Da) [C]

MBC (311,167 Da) [Q]

Figura 10 B

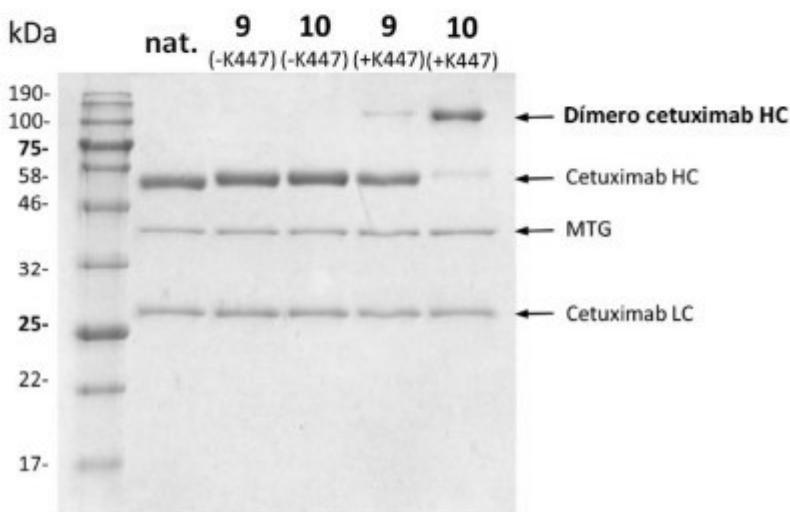


Figura 11

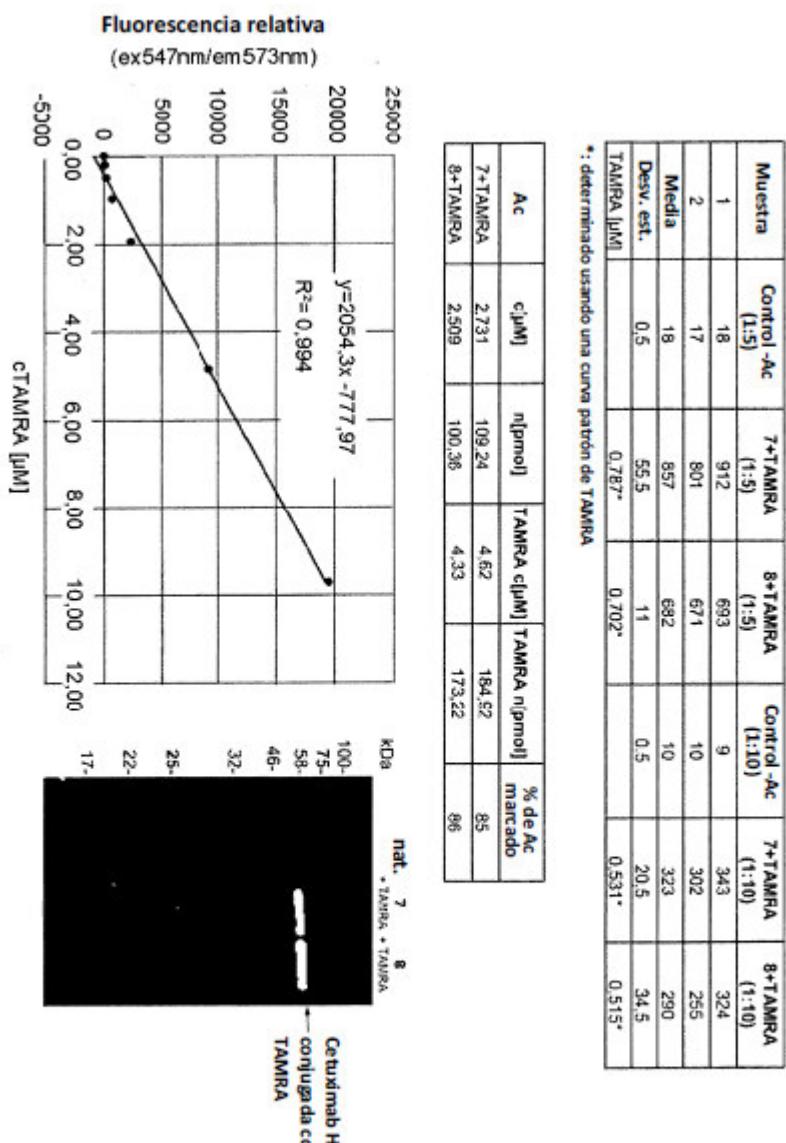


Figura 12

Muestra	1	2	3	Media	Desv. est.	cTioles [mM]	cProteína [mM]	cTioles/Proteína	Tioles/Proteína teórica
Lisozima [red.]	0,428	0,493	0,463	0,461	0,033	0,497	0,057	7,459	8
Lisozima	0,110	0,095	0,105	0,104	0,008	0,044	0,062	0,714	8
Cetuximab nat.	0,102	0,088	0,122	0,104	0,017	0,045	0,013	3,334	32
?	0,085	0,069	0,093	0,069	0,004	0,026	0,016	1,641	36
8	0,107	0,091	0,106	0,102	0,009	0,042	0,020	2,131	32

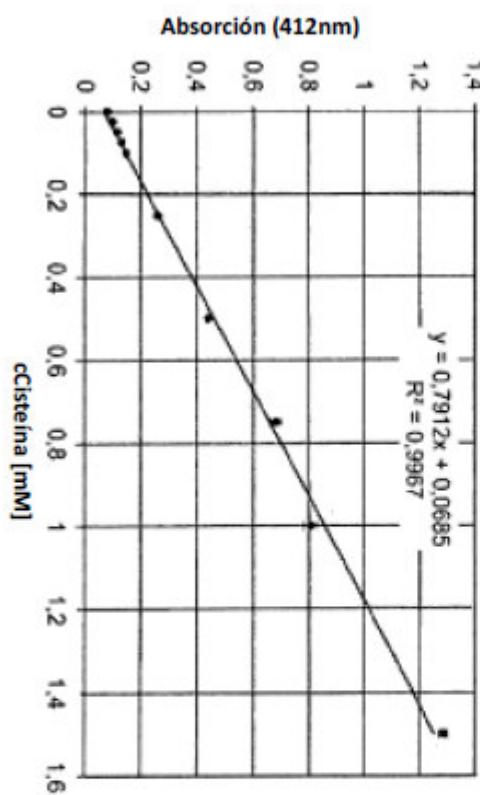


Figura 13

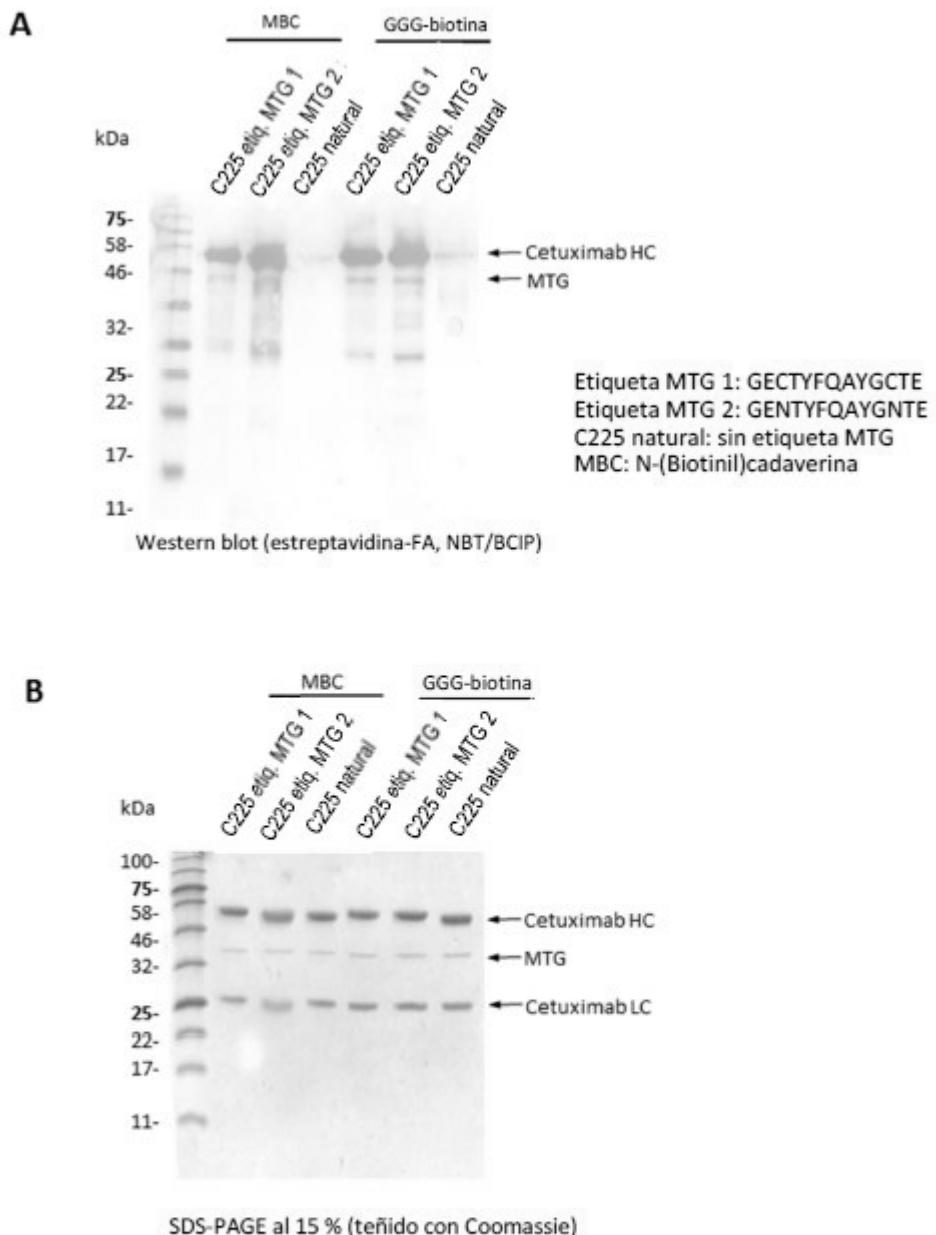
Conjugación de cetuximab con sustratos GGG mediante transglutaminasa microbiana (MTG)

Figura 14 A, B

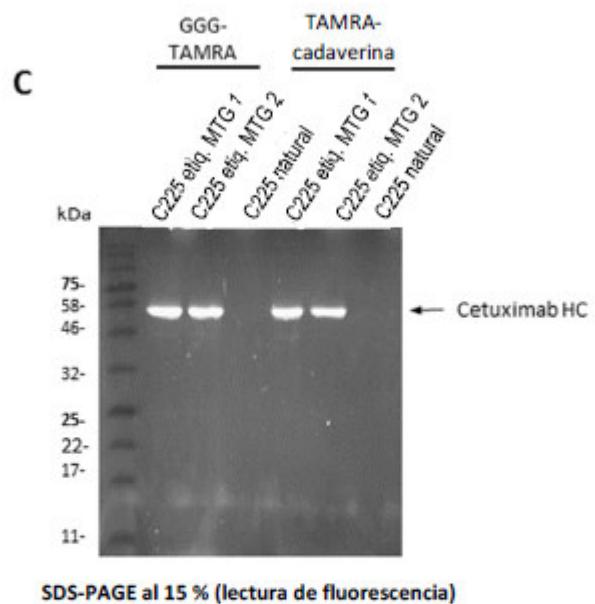
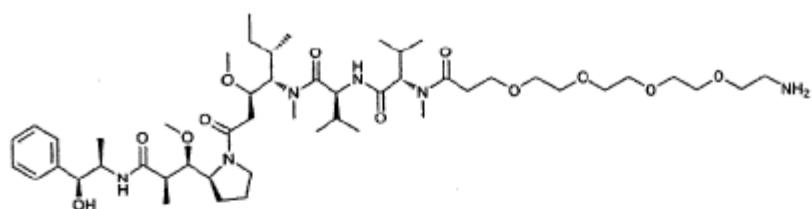
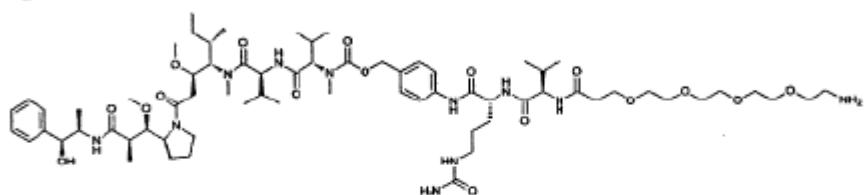
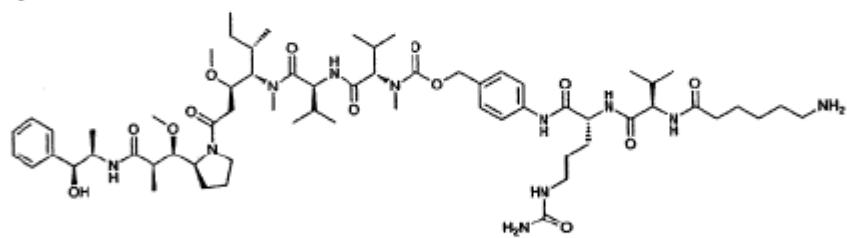
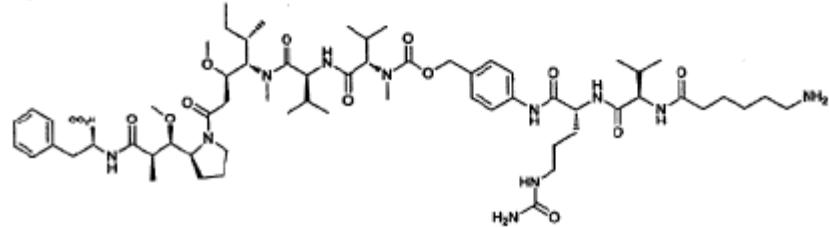


Figura 14 C

1**2****3****4****Figura 15**

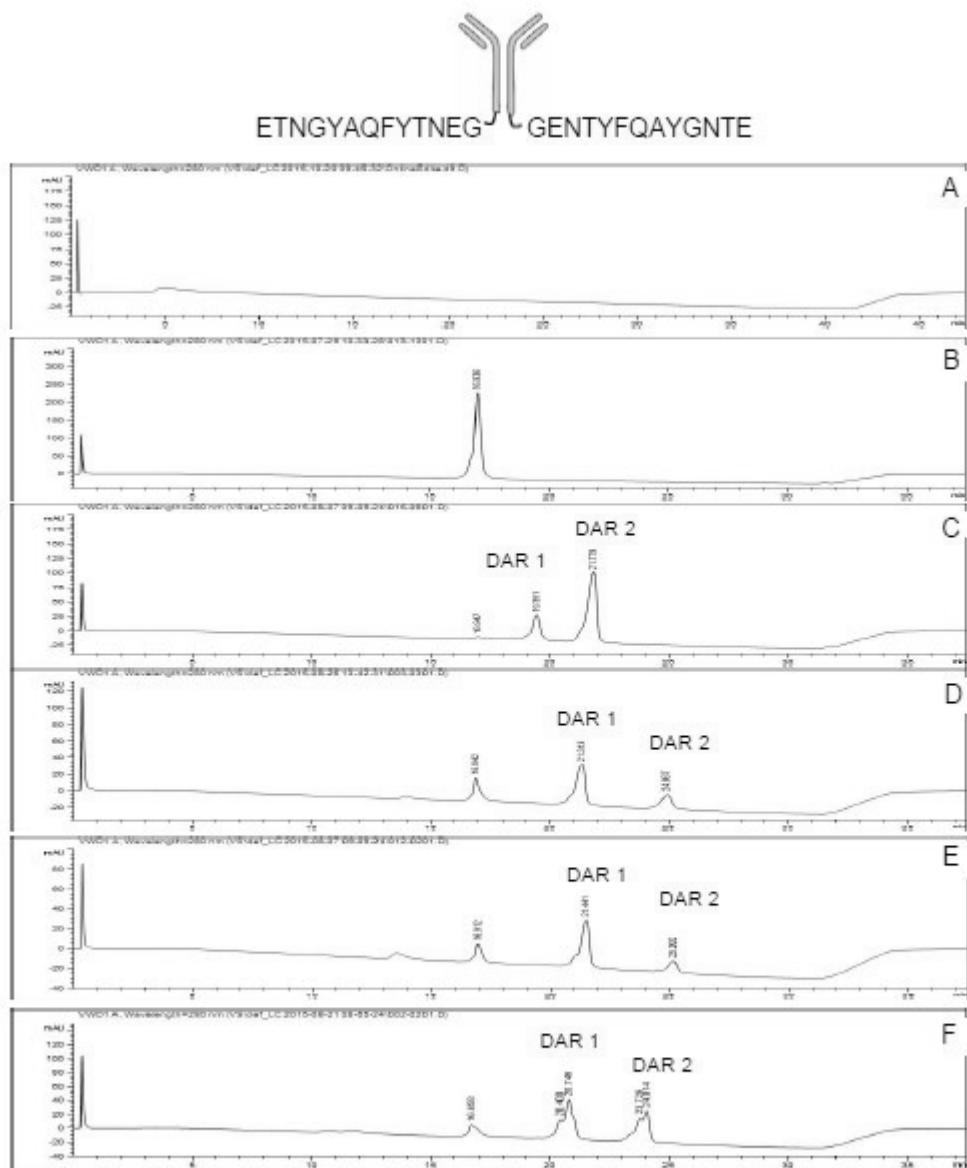


Figura 16